

A DAAM formin alcsalád szerepe az izomfejlődésben

Ph.D. értekezés

Készítette: Molnár Imre

Témavezető: Dr. Mihály József

**Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet**

**SZTE Természettudományi és Informatikai Kar
Szeged, 2014.**

Tartalomjegyzék

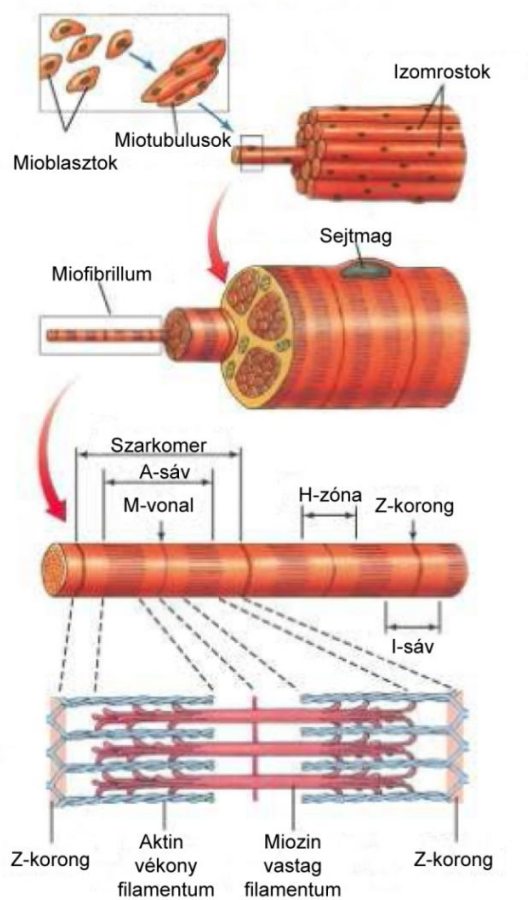
1. BEVEZETÉS.....	3
1.1. A harántcsíkolt izom általános felépítése.....	3
1.2. Izomfejlődés és szarkomer összeszerelődés.....	6
1.2.1. Szarkomer összeszerelődési modellek.....	8
1.3. A miofilamentumok összeszerelődése.....	12
1.3.1. A vastag (miozin) filamentumok kialakulása	13
1.3.2. Az aktin filamentumok összeszerelődése	14
1.4. Aktin összeszerelődés és filamentumhossz szabályozás a harántcsíkolt izmokban	25
1.5. A DAAM formin alcsalád.....	27
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
3. EREDMÉNYEK	31
3.1. A dDAAM mutáns izmok fenotípusa és élettani jellemzése.....	31
3.1.1. Az indirekt repülőizom szerkezete és fejlődése	31
3.1.2. A dDAAM-nak az izomfejlődésben betöltött szerepét vizsgáló kísérletek előzményei	34
3.1.3. A dDAAM mutáció befolyásolja a röpképességet és az indirekt repülőizom fejlődését..	37
3.1.4. Atomerő-mikroszkópiás mérések az indirekt repülőizom miofibrillumain.....	40
3.1.5. A dDAAM hatással van a lárvális szomatikus izmok és a szívcső fejlődésére	41
3.2. A dDAAM hiányos miofibrillumok vizsgálata	51
3.2.1. A dDAAM hiányos IFM szarkomerikus fenotípusa	51
3.2.2. A dDAAM mutánsok elektronmikroszkópos (EM) analízise	53
3.3. A dDAAM fehérje szarkomerikus lokalizációja	56
3.4. A dDAAM fehérje kölcsönhat a vékony filamentum mutánsokkal.....	59
3.5. A dDAAM fehérje szükséges a vékony filamentumok növekedéséhez.....	61
3.6. Evolúciós konzerváltság.....	67
3.7. A dDAAM és a miozin közötti kölcsönhatás.....	69
4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	73
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	79
5.1. Felhasznált Drosophila törzsek.....	79
5.2. Immunhisztokémia.....	81
5.2.1. Felhasznált elsődleges ellenanyagok.....	83
5.2.2. Felhasznált másodlagos ellenanyagok	83

5.2.3.	<i>Felhasznált egyéb reagensek</i>	84
5.3.	Lárvális testhossz és mászási sebesség mérések	84
5.4.	Repülési teszt	85
5.5.	Sejtkultúrák és egér izom preparátumok előkészítése	85
5.6.	Elektronmikroszkópos analízis	86
5.7.	Atomerő-mikroszkópos mérések	86
5.8.	Western-blot	87
5.9.	Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata	87
5.10.	Statisztikai analízis	88
6.	FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK	89
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	91
8.	SUMMARY	96
9.	IRODALOMJEGYZÉK	102

1. BEVEZETÉS

1.1. A harántcsíkolt izom általános felépítése

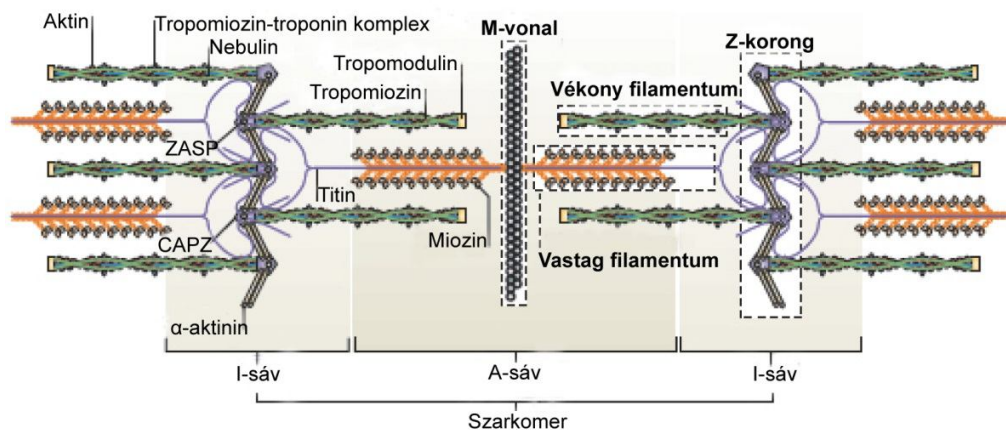
A harántcsíkolt izomban három fő szerveződési szintet lehet megkülönböztetni: az izomrostok, a miofibrillumok, és a miofilamentumok szintjét. Az izomrostok a mioblasztok összeolvadásából létrejött úgynevezett szincíciumok. Citoplazmájuk nagy részét a kontraktilis állomány tölti ki, ami több száztól több ezerig terjedő párhuzamosan futó miofibrillumból áll.



1. ábra A harántcsíkolt izom felépítése. A harántcsíkolt izom fő szerveződési szintjei: az izomrostok, a miofibrillumok, és a miofilamentumok szintje. A két Z-korong közé eső rész a szarkomer, az izom szerkezeti és működési egysége. Forrás: Eckert, Animal Physiology 2002.

A miofibrillumok harántcsíkolt mintázata a szarkomerikus fehérjék rendkívül szabályos elhelyezkedésének tulajdonítható; fénymikroszkópos szerkezetük alapján osztották fel őket A- és I- sávokra. Az elnevezés onnan ered, hogy ha mikroszkópban az izmot polarizált fénnel világították meg, akkor az „I” az izotróp, világos, míg az „A” az anizotróp, sötét sávnak mutatkozott. Elektronmikroszkóppal

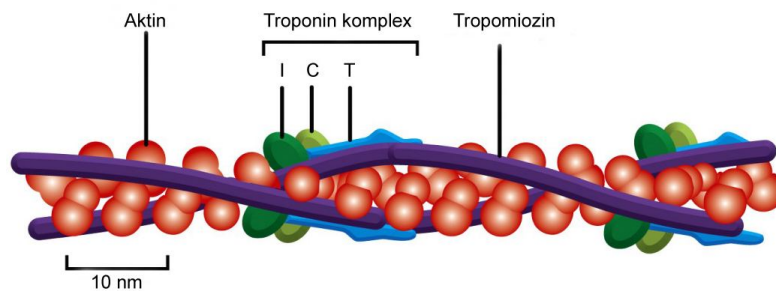
tovább vizsgálva, a világos I-sávok közepén sötét vonalak formájában található a Z-korong (az izom hisztológiában alkalmazott elnevezés szerint a „Z” a német „Zwischenscheibe” - az I-sávok közötti korong - elnevezésre utal). Míg az anizotróp, sötét sáv közepén egy újabb világos H-sáv (a német „Helle” – világos - elnevezés után), és az M-vonal (a német „Mittel” – közép - elnevezés itt a szarkomer közepére utal), található (**1. ábra**). A miofibrillumok miofilamentumok kötegeiből állnak, amelyeket a szarkoplazmás retikulum ciszternái, mitokondriumok és glikogén-szemcsék vesznek körül. A miofilamentumokat magasan szerveződött makromolekuláris komplexek alkotják, amelyek fő alkotóelemei a miozin II-t tartalmazó vastag filamentumok, és az aktint tartalmazó vékony filamentumok. Az A-sávnak megfelelő részt foglalják el a vastag filamentumok, míg az I-sáv adja azt a régiót, ahol a vékony filamentumok nem fednek át a vastag filamentumokkal. A két Z-korong közé eső rész a szarkomer, az izom szerkezeti és működési egysége. A szarkomer közepén az M-vonal fehérjék keresztkötik és kihorgonyozzák egymáshoz a vastag filamentumokat (**1. ábra, 2. ábra**).



2. ábra A szarkomer szerkezete. Az ábrán nagyobb felbontásban látható az előbbi képen ábrázolt szarkomer. Az ellentétes polaritású vékony filamentumokat az α -aktinin keresztköti és rögzíti a Z-korongok mindkét oldalához. A vékony filamentumok F-aktinból és a hozzájuk kapcsolódó Tropomiozin-Troponin komplexből állnak. Gerincesek esetében a vékony filamentumok Nebulint is tartalmaznak, amely a filamentumok hosszát szabályozza. A vékony filamentumok plusz végét a CAPZ míg mínusz végét a Tropomodulin fehérje zárja le. A ZASP fehérje a Z-korongok szerveződésében játszik szerepet. A vastag filamentumokat az M-vonal fehérjék rögzítik. A gerincesekben a Titin molekulák az M-vonaltól a Z-korongokig terjednek. A vastag filamentumokat rögzítik, és elasztikus rendszert alkotva megakadályozzák a miofilamentumok túlzott megnyúlását. Forrás: Sparrow és Schöck 2009.

A vastag filamentum néhány száz miozin II molekulát tartalmaz antiparallel elrendezésben, vagyis az ellentétes irányú miozin molekulák farki részei a Miomezin fehérje segítségével összekapcsolódnak. A miozin molekula két motorikus nehéz láncból (MHC) áll, végükön található a “fej”-régió. Ily módon bipoláris szerkezetet vesznek fel, amelyben a fejek oldalirányban állnak. A fejhez két pár (fajspecifikus) könnyű lánc (MLC) kapcsolódik. A könnyű lánc párok közül az egyik mindig az eszenciális könnyű lánc (ELC), a másik a regulációs könnyű lánc (RLC).

A vékony filamentumokat a globuláris szerkezetű aktin monomerek (G-aktin) polimerizálódásával keletkező kettős hélix szerkezetű filamentáris aktin (F-aktin) (Chesarone and Goode, 2009) és a Tropomiozin-Troponin komplex alkotja. Az F-aktin hélixhez kapcsolódnak a Tropomiozin dimerek, melyek szintén helikális szerkezetet vesznek fel, a ~ 38 nm hosszú hélixük hét aktin monomernyi távolságon ível keresztül. A dimerek végei szorosan egymáshoz kapcsolódnak, így a Tropomiozin ív az aktin filamentum mentén folyamatos. A Tropomiozin molekulákon keresztül kötődik az aktin filamentumokhoz a három alegységből álló Troponin komplex. Ezekből a Troponin-T alegység (TnT) a Tropomiozinhoz kötődik, a Troponin-C (TnC) kalcium-ionokat köt, végül a Troponin-I (Tn-I) az aktin-miozin kapcsolódást gátolja (Au 2004; Gunning 2008) (**3. ábra**). A vékony filamentumok párhuzamos sorokba rendezve rögzülnek a Z-korongokhoz, amit az α -aktinin fehérje keresztkötő aktivitása biztosít. Gerincesekben a harántcsíkolt izmok vékony filamentumai még egy járulékos fehérjét tartalmaznak, a Nebulint. Ez egy hosszú, fonál-alakú, rugalmatlan fehérje, amely az aktin-filamentumokkal párhuzamos lefutású, azokat a Z-korongokhoz rögzíti, és valószínűleg részt vesz a vékony filamentumok hosszának szabályozásában (Bang és mtsai. 2006; Witt és mtsai 2006).



3. ábra A vékony filamentumok szerkezete. Az F-aktin hélixhez kapcsolódnak a Tropomiozin dimerek. Mivel a dimerek végei szorosan egymáshoz kapcsolódnak, így a Tropomiozin ív az aktin filamentum mentén folyamatos. Ezen a Tropomiozin íven keresztül pedig a három alegységből álló Troponin komplex kötődik az aktin filamentumokhoz. Forrás: Alberts és mtsai. 2002.

A miofibrilláris vastag és vékony filamentumok egymáshoz viszonyított szarkomerikus helyzete szigorúan szabályozott. Rovarak repülőizmaiban például egy-egy miozin filamentumot hat vékony filamentum vesz körül hexagonális elrendezésben. A vastag filamentumok miozin II fehérjéinek globuláris feji része képes a vékony filamentumok F-aktinjához kötődni, ami az izomösszehúzódás alapjául szolgál, hiszen az aktomiozin kölcsönhatás eredményeként az egymáson elcsúszó két filamentum rendszer a szarkomerek megrövidülését okozza (Lymn és Taylor 1971). Az aktin és miozin fehérjék kapcsolódását, tehát végső soron az izomösszehúzódást, a Tropomiozin-Troponin komplex szabályozza.

A vékony és vastag filamentumok mellett a miofibrillumok harmadik fő filamentum rendszerét a Titin filamentumok alkotják. A Titin óriásmolekula a Z-korongtól az M-vonalig terjed és így módon egymáshoz rögzíti a szarkomer széli és központi szerkezeti elemeit. A Titin filamentumok egy masszív elasztikus rendszert alkotnak, aminek az a legfontosabb szerepe, hogy megakadályozza a miofilamentumok túlzott megnyúlását (**2. ábra**) (Clark és mtsai. 2002).

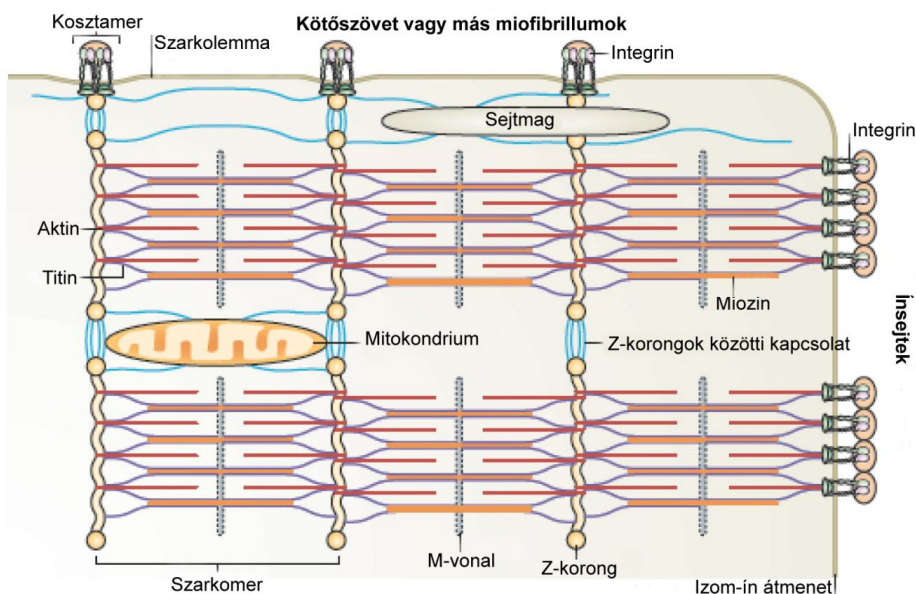
1.2. Izomfejlődés és szarkomer összeszerelődés

Az izomfejlődés egy többlépéses folyamat, amely bizonyos sejteknek izom prekursor sejtekké vagy mioblasztokká válásával kezdődik. A paraxiális myotomban és a dermomyotomban bizonyos mioblaszt őssejtekben a *pax-3* gén kezd aktiválódni és magas szinten kifejeződni, amit a miogenezis szabályozó gének, a bHLH (basic helix-loop-helix)

fehérjecsaldába tartozó transzkripciós faktorok expressziója követ (Brand-Saberi 2005). A bHLH faktorokat termelő sejtek már mioblasztok, melyek az izomszövetté differenciálódás irányába indultak. Ezek egy aktív osztódási fázison mennek keresztül, ahol a számuk megsokszorozódik. Ezt követően vándorolnak és sorokba rendeződnek, majd fuzionálva többsejtmagvú, szinciciális miotubulusokat hoznak létre vagy közvetlenül kardiomiocitákká differenciálódnak. Ezután az extracelluláris mátrixhoz (ECM) vagy más izomsejtekhez kapcsolódnak mielőtt miofibrillumokat képeznének. A miofibrillogenezis kezdeti szakaszában egy szarkomerekből álló sor jön létre. Ezek a szarkomerek később szélességükben, bizonyos izmokban hosszúságukban is növekednek, és szorosan kapcsolódnak egymáshoz, vagy esetenként a szarkolemmához. A képződő miofibrillumok fokozatosan kitöltik a sejt belsejét, egymáshoz és a miocita sejtorganellekhez. Desmin gazdag intermedier filamentumokon keresztül kapcsolódnak addig, amíg az összes rendelkezésre álló helyet el nem foglalják, csak keskeny részeket hagyva a szarkoplazmatikus retikulum, a mitokondriumok és a sejtmagok számára. További mioblasztok egyesülnek a miotubulusok növekvő végeivel addig, amíg a soksejtmagvú szincícium egy érett, teljesen differenciálódott izomrosttá nem válik (Sanger és mtsai. 2010), amelyben felnőtt miozin izoformák helyettesítik az embrionális, korai izoformákat (Rosser és mtsai. 1998; Agbulut és mtsai. 2003).

Az izomrostok végei a vázrendszerhez az izom-ín átmeneten keresztül csatlakoznak, vagy a szívizom esetében egy hálózatos membránrendszeren (intercalated discs) keresztül kapcsolódnak szorosan egymáshoz. A heterodimerikus Integrinek, amelyek a vékony filamentumokat az ECM-hez kapcsolják, a fő strukturális és funkcionális komponensei az izom-ín átmeneteknek. A periferiális miofibrillumok a Z-korongok szintjén oldalirányban is ki vannak

horgonyozva az ECM-hez, a gerincesekben és a gerinctelenekben egyaránt (Moerman és Williams 2006; Hudson és mtsai. 2008; Pardo és mtsai. 1983) (**4. ábra**).



4. ábra A harántcsíkolt izomrost vázlatos áttekintése. Egy harántcsíkolt izomrost szagittális metszeti képe, amely két miofibrillumot, a közöttük levő kapcsolódást és a szarkolemmát ábrázolja. Csak a fő szarkomerikus alkotóelemek – az aktin, a miozin és a Titin – lettek feltüntetve. A gerincesek esetében, a miofibrillumok egymáshoz és a kosztamerekhez intermedier filamentum fehérjék (világoskékkel jelölve) és más citoszeletális fehérjék (sárga körökkel jelölve) segítségével kötődnek. Az izom-ín átmenetek szintjén, a transzmembrán Integrinek a miofibrillumokat adapter fehérjéken (zöld oválisokkal jelölve) keresztül rögzítik az ín mátrixhoz (narancs oválisokkal jelölve). A kosztamerek a Z-korongokat kapcsolják a környező kötőszövethez vagy más miofibrillumokhoz. Forrás: Sparrow és Schöck 2009.

Ezeket az adhéziós helyeket nevezik kosztamereknek, és ezek az izom-ín átmenetekhez hasonlóan egy sor olyan alkotóelemből állnak, mint a fokális adhéziók a nem-izom sejtek esetében (Pardo és mtsai. 1983; Ervasti és mtsai. 2003; Quach és mtsai. 2006) (**4. ábra**).

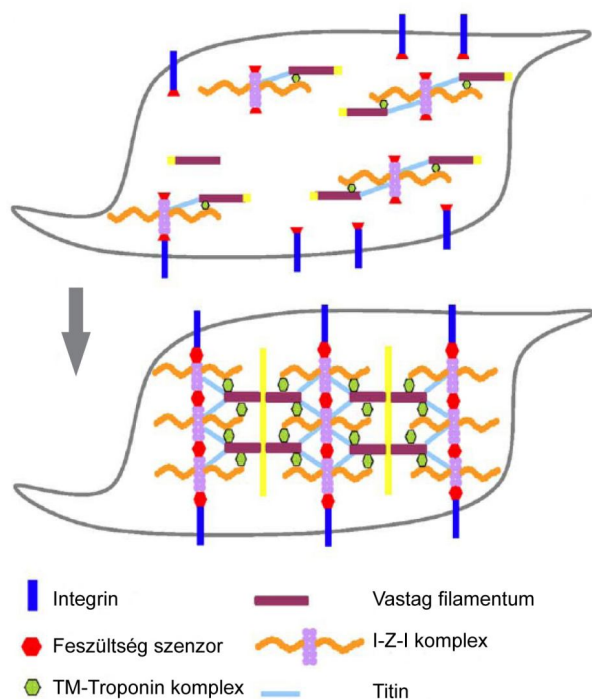
1.2.1. Szarkomer összeszerelődési modellek

Az izom differenciációt érintő fontos kérdés, hogy a harántcsíkolt izomsejt hogyan képes egy ilyen szabályosan ismétlődő, szigorúan rendezett szarkomerekből álló szerkezetet létrehozni a miofibrillogenezis során, más szóval, hogyan zajlik a szarkomer összeszerelődés? Ezzel kapcsolatban többféle elképzelés létezik, a legfontosabbak közülük: a független összeszerelődési-, a „titin mint szarkomerikus váz”- és a premiofibrillum modell. Az alábbiakban

ezeket foglalom röviden össze, szem előtt tartva azt a tényt, hogy az itt felsorolt elképzelések a különböző modellszervezetek vad típusú és mutáns szarkomerikus struktúráinak megfigyelése alapján születtek, és ha a szarkomerogenezis folyamatának egészét tekintjük, a felsorolt modelleknek nem feltétlenül kell kizárniuk egymást.

A **független összeszerelődési modell** alapja, hogy a miofibrillogenezis kezdeti lépései során bipoláris miozin filamentumok és úgynevezett I-Z-I komplexek szerelődnek össze egymástól függetlenül (Holtzer és mtsai. 1997), amelyek aztán később integrálódnak a jól ismert szarkomerikus szerkezetekbe. Az I-Z-I komplexek ellentétes irányítottágú vékony filamentumokból és az azokat egyesítő Z-korong kezdeményből álló struktúrák, amelyek elektronmikroszkópos felvételeken sűrű α -aktinin nyalábokként jelennek meg, amelyekből aktin filamentumok ágaznak szét. A fő megfigyelés, ami ezt az elméletet alátámasztja az, hogy aktin hiányában a szarkoplazmában szabadon sodródó A-sáv struktúrák láthatók, míg a miozin hiányos izmokban vékony filamentumokkal összekapcsolódott szabálytalan szerveződésű Z-korongok

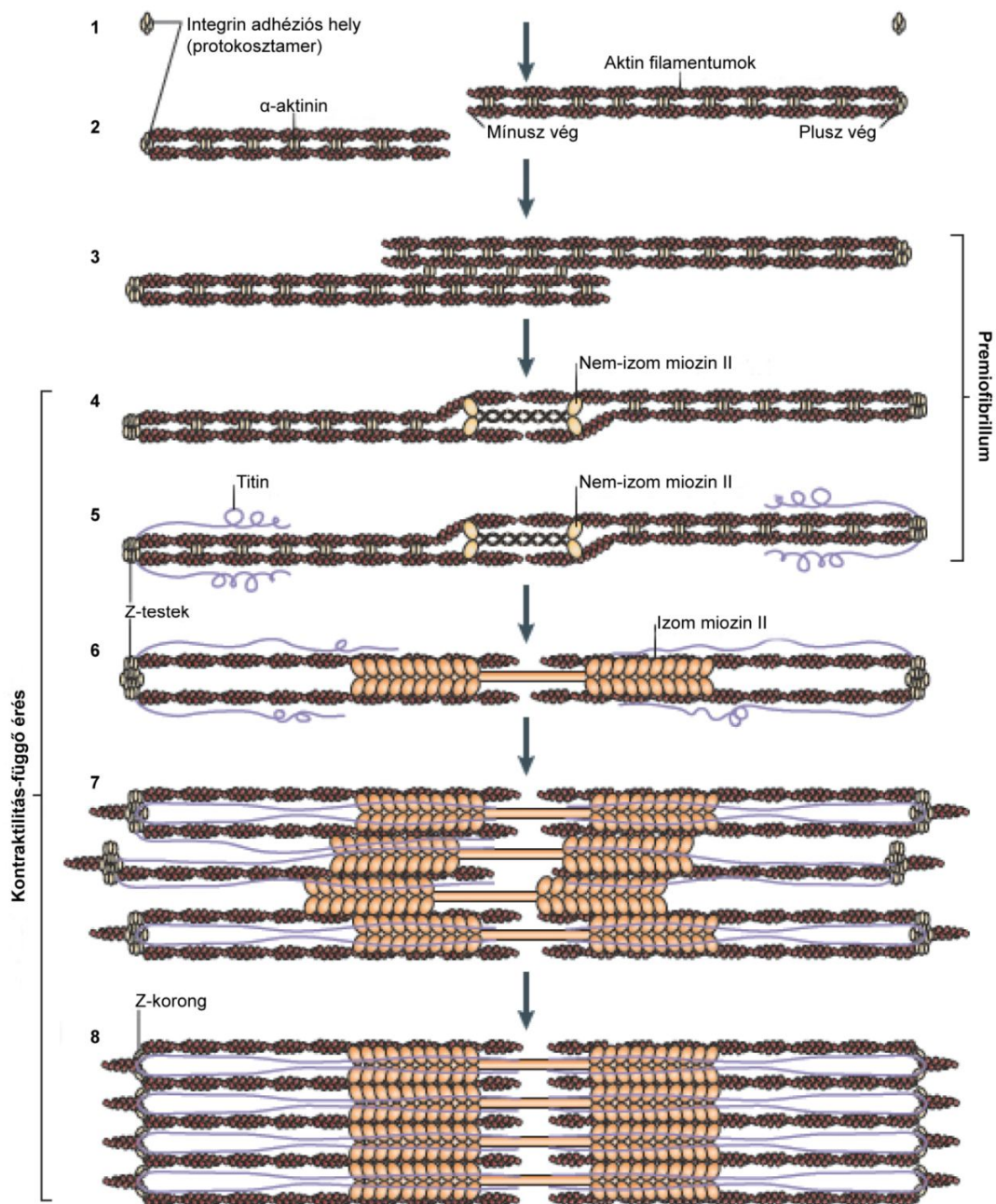
találhatók (Holtzer és mtsai. 1997; Lin és mtsai. 1994) (**5. ábra**).



5. ábra A független szarkomer összeszerelődési modell. A szarkomerek kialakulását megelőzően, a különböző komplexek, az Integrineket, a feszültség szenzorokat, az I-Z-I komplexeket, a vastag filamentumokat és a Tropomiozin-Troponin komplexeket is beleértve, egymástól függetlenül szerelődnek össze. Ezt követően az Integrin fehérjékkel kölcsönhatva hozzák létre a szigorúan rendezett szarkomer szerkezetet. Ezen komplexek bármelyikének az eltávolítása az egész szerkezet összeomlását vonja maga után. Forrás: Rui és mtsai. 2010.

A „**Titin mint szarkomerikus váz**” modell azon alapszik, hogy a szarkomer összeszerelődés vázát a Titin óriásmolekula adja. Mivel ismert, hogy az aktin és a Titin filamentumok már jóval a vastag filamentumok kialakulása előtt megjelennek, felmerült az a lehetőség, hogy az M-vonal és a Z-korongok egymáshoz viszonyított végső távolsága a Titin óriásmolekulától függ, amely szarkomerikus vázként is szolgálhat a két másik miofilamentum rendszer számára. Az óriás fehérjelánc növekedése során képződő új fehérje domének további vastag filamentum és M-vonal alkotóelemeket gyűjtenek maguk köré, és ahogy a Titin fehérje kialakítja végső konformációját, a C-terminális régiója mellett az M-vonal végső struktúrája is létrejön (Ehler és Gautel 2008). A Titin fehérje C-terminális irányból csonkolt formáinak az összehasonlításából az derült ki, hogy a csonkolás mértékével arányosan károsodik a vastag filamentumok és a szarkomerek szerveződése (Miller és mtsai 2003).

A miofibrillum képződésre vonatkozó elképzelések harmadik csoportját a „**premiofibrillum**” alapú modell alkotja. Ez a differenciálódó csirke kardiomiocita sejttenyészetek tanulmányozásán alapuló modell azt javasolja, hogy a miofibrillogenezis során először *de novo* módon úgynevezett premiofibrillumok képződnek a sejthártya közelében (Heuson-Stiennon 1965; Kelly 1969), amelyek főként aktinból és aktin asszociált fehérjékből (Tropomiozin/Troponin komplex, α -aktinin), illetve nem-izom miozinokból (NMM) állnak. A premiofibrillumok aktin stressz-filamentumokra emlékeztető struktúrák, amelyek szabálytalan periodicitású α -aktinin és nem-izom miozin felhalmozódást mutatnak. Később ezekből lesznek az érett miofibrillumok, ahol az érés során a nem-izom miozin izom típusú miozinnal helyettesítődik (Rhee és mtsai. 1994; LoRusso és mtsai. 1997) (**6. ábra**).



6. ábra A premiofibrillum modell. A protokosztamerek, amelyek az izomsejt mentén véletlenszerűen helyezkednek el, aktin filamentumokat polimerizálnak (1-2. lépés) (Az egyszerűség kedvéért adhéziós helyenként csak két aktin filamentum van ábrázolva). Az ellentétes polaritású és egymással átfedő aktin filamentumokat az α -aktinin keresztköti (3. lépés). Az oldalirányból fuzionált antiparallel aktin filamentumok nem-izom miozin II-t építenek be, amely kiszorítja az α -aktinint (4. lépés). A nem-izom miozin II bipoláris filamentumok száma a stresszrostokban levő aktin filamentumok számától függ. A protokosztamerek Titint és még több α -aktinint gyűjtenek maguk köré, aminek eredményeként kialakulnak a Z-testek (5. lépés). A következőkben az izom típusú miozin II beépülése történik meg, valószínűleg a Titin segítségével (6. lépés). A kontraktilitás-függő érési folyamat során a Z-testek hosszanti irányban egymáshoz igazodnak (7. lépés). Ezek után a Z-testek oldalirányban Z-korongokká egyesülnek (8. lépés). Forrás: Sparrow és Schöck 2009.

Ez a modell összhangban van azokkal az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal, amelyek során megfigyelték, hogy a Z-korongok először mint kisméretű membrán asszociált aggregátumok jelennek meg. Ezek a már említett, Z-testeknek nevezett kezdemények később növekedésnek indulnak, oldalirányban fuzionálnak egymással, így alakítva ki az érett Z-korongokat (Heuson-Stiennon 1965). Immunofluoreszcens és elektronmikroszkópos felvételek azt mutatták, hogy a Z-testek, az α -aktinin és a Titin (a két legkorábbi Z-korong marker) felhalmozódásának helyei, ezzel bizonyítva, hogy a Z-testek valóban a Z-korongok elődjének tekinthetők (Tokuyasu 1989). Összességében a jelenleg ismert kísérleti adatok fényében a premiofibrillum elmélet a legáltalánosabban elfogadott nézet a miofibrillumok összeszerelődésére.

1.3. A miofilamentumok összeszerelődése

Az eddig összefoglaltak alapján nyilvánvalónak látszik, hogy a miofibrillogenezis sok lépésből álló, bonyolult folyamat, mindamellett ennek a folyamatnak kitüntetett része a miozin és aktin filamentumok összeszerelődése. Jól ismert, hogy *in vitro* körülmények között mind a miozin, mind az aktin képes polimerizálódni és olyan filamentáris struktúrákat létrehozni, amelyek hasonlóak a vastag filamentumokhoz (Niederman és Pollard 1975) és a vékony filamentumok F-aktinjához (Cooper és mtsai. 1983). Azt is tudjuk azonban, hogy *in vivo* körülmények között ezek a folyamatok szigorúan szabályozottan zajlanak és -főként az aktin esetében- számos járulékos fehérje részvételével történnek. Az alábbi fejezetekben a miofilamentumok, különösen az aktin filamentumok kialakulására vonatkozó ismereteket foglalom össze.

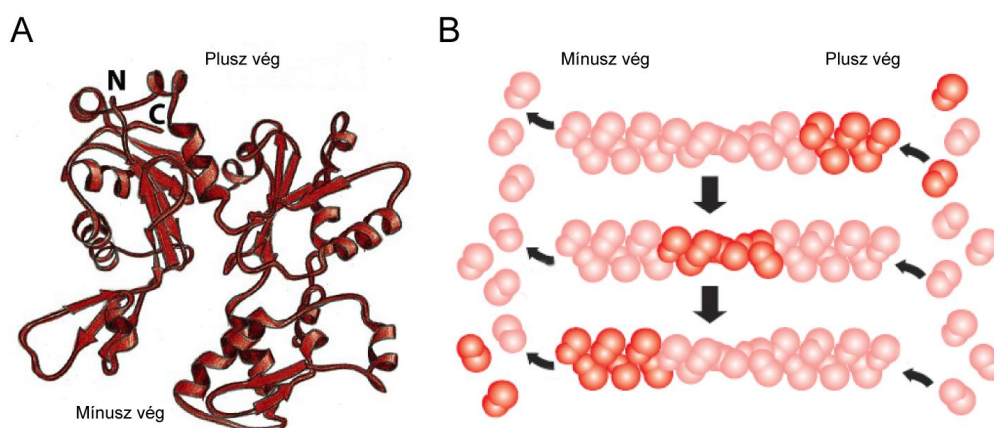
1.3.1. A vastag (miozin) filamentumok kialakulása

A nem-izom miozin II-ről tudjuk, hogy képes önállóan összeszerelődni rövid bipoláris minifilamentumokba, amelyek a kortikális sejtvázban és a stressz-rostokban fordulnak elő (Scholey és mtsai. 1980). Ezzel a „spontán” összeszerelődési képességgel valószínűleg az izom miozin II is rendelkezik, legalábbis mind ez idáig nem azonosítottak olyan fehérjét, ami specifikusan elősegítené a miozin molekulák polimerizációját. Viszont nemrég kimutatták, hogy az izom típusú miozin II globuláris fej régiójának feltekeredéséhez (foldingjához), illetve a magasabb szervezettségű szarkomerikus vastag filamentumok összeszerelődéshoz nélkülözhetetlenek az izom specifikus molekuláris chaperonok (Kim és mtsai. 2008; Chow és mtsai. 2002). A miozin II nem képes a motorfehérje funkcióját megtartani, ha *in vitro* körülmények között vagy bakteriális rendszerekben expresszáltatják (Chow és mtsai. 2002; Levitsky és mtsai. 1990), ami a chaperonok segítségével megvalósuló fehérje folding fontosságát bizonyítja. Ebben az összefüggésben „chaperon”-nak tekintünk minden olyan faktort, amely közvetlenül érintett a fehérje folding és stabilitás megteremtésében, függetlenül a fehérje aggregációt megelőző szerepétől. A miozin II megfelelő foldingját olyan hőszokk fehérjék végzik, mint a Hsp90, a Hsp70, és az Unc45 (Liu és mtsai. 2008b; Srikakulam és Winkelmann 2004; Willis és mtsai. 2009). Gerincesekben a Hsp90 fehérjecsaldnak két izoformája ismeretes (a Hsp90a1 és a Hsp90a2), amelyek a vastag filamentumok megfelelő kialakulásához szükségesek. Ezek a chaperonok specifikusan a fejlődő szív és vázizomzatban fejeződnak ki (Krone és mtsai. 2003; Etard és mtsai. 2007), míg más izoformák expressziója sokkal általánosabb jellegű (Thisse és mtsai. 2004). Habár az izom specifikus chaperonok lokalizációja az érett miofibrillumokban a Z-korongok szintjére korlátozódik, izom károsodás során áthelyeződnek az A-sávba, oda ahol az újból keletkező miozin filamentumok összeszerelődése történik (Etard és mtsai. 2008). Az ezeket

a chaperonokat kódoló gének mutációi gyakran társulnak különböző izomszintű megbetegedésekkel, miopátiákkal (Vogel és mtsai. 2009), ami arra utal, hogy a citoskeletális váz épsége elengedhetetlen a funkcionális miozin motorfehérjék későbbi összeszereléséhez.

1.3.2. Az aktin filamentumok összeszerelődése

Az F-aktint felépítő aktin monomerek eredendő polaritásából adódóan az aktin filamentumok szerkezetileg polarizáltak (7. ábra). *In vitro* körülmények között, kellően magas aktin monomer koncentráció mellett a G-aktinból spontán polimerizációval F-aktin képződik. Az így kialakuló filamentumok mindkét végén történhet monomer addíció és disszociáció is, azonban az úgynevezett szöges (plusz) végén kb. 7-8-szor nagyobb az addíció sebessége, mint a hegyes (mínusz) végén.



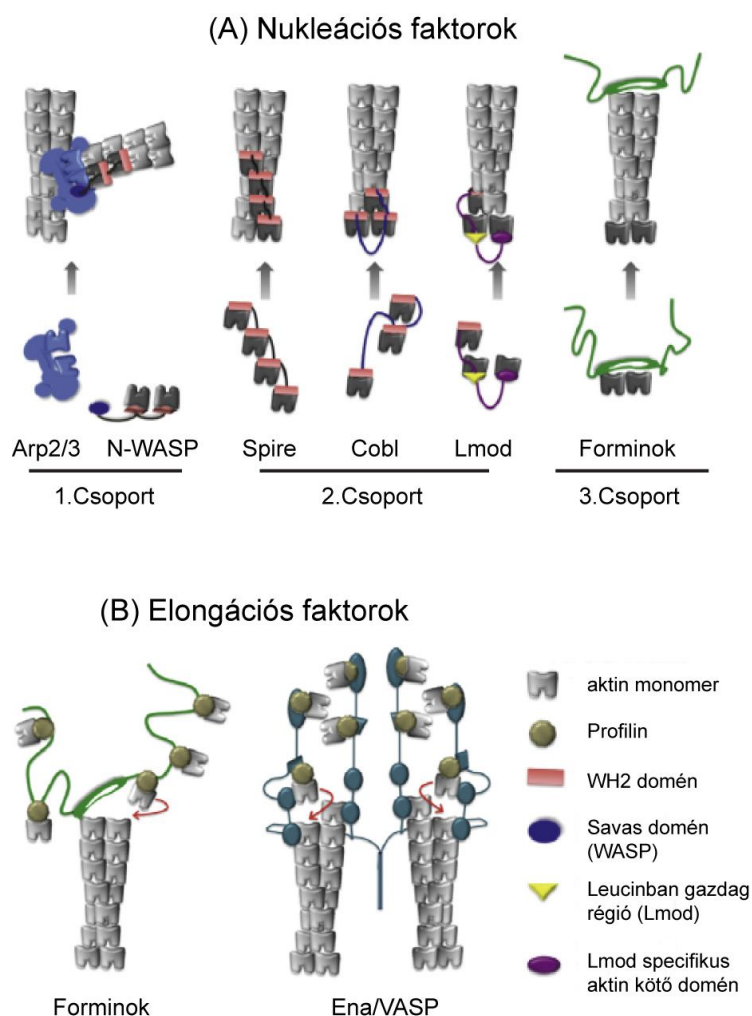
7. ábra Az aktin filamentumok „taposómalom” modellje. Az (A) panelen látható a monomer aszimmetrikus, polarizált szerkezete, aminek következtében a filamentumok is szerkezetileg polarizáltak. (B) Ez a sematikus modell szemlélteti, hogy az aktin filamentumnak ebben az egyensúlyi állapotában az alegységek beépülési aránya a plusz végén megegyezik a mínusz végén zajló depolimerizáció arányával. Ennek következtében a polimer képes egy állandó hossz megtartására, annak ellenére, hogy az őt felépítő alegységek állandó áramlásban vannak. Forrás: Alberts és mtsai. 2002.

In vivo körülmények között egy még nyilvánvalóbb kinetikai polarizáltság jellemző az aktin filamentumokra, amit az úgynevezett „taposómalom” (treadmilling) modellel jellemeznek. Ennek az a lényege, hogy sejtekben monomer addíció kizárólag a filamentumok plusz végén történik, míg a hegyes vég a monomerek disszociációjának, a filamentum depolimerizálódásának

a helye (**7. ábra**). Az aktin filamentumok kialakulásának kritikus első lépése az aktin nukleáció, amelynek során néhány aktin monomer egyesül, hogy egy nukleációs magot, azaz egy olyan 3-4 monomerből álló filamentum kezdeményt hozzon létre, amely kiindulópontként szolgálhat a további polimerizáció számára. *In vitro* körülmények között a nukleációs magok kialakulását a magas G-aktin koncentráció biztosíthatja, a nukleációhoz szükséges koncentrációt kritikus koncentrációnak nevezzük. *In vivo* körülmények között azonban a szabad G-aktin koncentráció alacsonyabb, mint a kritikus koncentráció, ezért a spontán nukleáció kinetikailag gátolt és így a sejtek elkerülik az anarchikus filamentum képződést. Annak érdekében, hogy az aktin filamentumok képződése térben és időben szabályozott módon történjen, olyan fehérjék vannak jelen a sejtekben, amelyek képesek közvetlen módon elősegíteni az aktin nukleációs magok kialakulását. Ezeket a fehérjéket összefoglalóan aktin nukleációs vagy aktin összeszerelő faktoroknak nevezzük. Amennyiben egy nukleációs mag már kialakult, a filamentum növekedése *in vivo* is kinetikailag előnyössé válik, ám ilyenkor nem G-aktin, hanem annak ATP-vel és egy aktin monomer-kötő fehérjével, a Profilinnel alkotott komplexe épül be a növekvő filamentum plusz végén.

Irodalmi adatok alapján az eddig azonosított aktin nukleációs faktorokat molekuláris működés módjuk alapján három csoportba sorolhatjuk (Chesarone és Goode 2009). Az első csoport tagjai nukleációs magok strukturális imitálásával, a második csoport tagjai aktin monomerek megkötésével és nukleációs maggá való alakításával, végül a harmadik csoport tagjai a spontán kialakult polimerizációs intermedierek stabilizálásával hozzák létre a nukleációs magot. A három nagy csoportba viszonylag kisszámú fehérje tartozik: az Arp2/3 komplex az első, a WASP-Homológia 2 (WH2) domént tartalmazó fehérjék a második, míg a forminok a harmadik csoport tagjait alkotják (**8. ábra A**). Megjegyzendő, hogy a forminok nem csak

nukleációs faktorként működnek, hanem a növekvő filamentumok plusz végéhez kötődve elősegítik további aktin monomerek beépítését is, tehát elongációs szerepük is van (Pollard 2007; Goode és Eck 2007; Higgs 2005). Jelenlegi ismereteink szerint az Ena/Vasp fehérjék is elongációs faktorokként szerepelnek (Haffner és mtsai. 1995; Ahern-Djamali és mtsai. 1999) (8. ábra B).



8. ábra Aktin nukleációs és elongációs faktorok. Az (A) panelen az említett három nukleációs faktor feltételezett működési mechanizmusa látható. A nukleációban szerepet játszó domének különböző színekkel, azok az aktin alegységek, amelyek nukleációs magként szolgálnak, pedig feketével jelöltek. (B) A forminok és az Ena/Vasp fehérjecsald befolyásolják az aktin filamentumok elongációját. Az Ena/VASP fehérjecsald működésmódja még nem teljesen ismert. Forrás: Chesarone és Goode 2009.

1.3.2.1. Az Arp2/3 komplex szerkezete és működése

Elsőként az Arp 2/3 (Actin-related protein) típusú fehérjék nukleációs aktivitását mutatták ki (Goley és Welch 2006). Ez egy 220 kDa-os fehérje komplex, amely hét, eukarióta szervezetekben magasan konzervált polipeptidláncból áll. Az Arp2 és Arp3 mellett ide tartoznak az ARPC1-ARPC5 alegységek is. Ez a komplex elágazó aktin filamentumokat alakít ki azáltal, hogy egy meglévő filamentum oldalához kapcsolódik, és ott egy újabb filamentum képződését indítja el, amely a kiindulási filamentummal 70°-os szöget fog bezárni. Az Arp2/3 komplex önmagában inaktív, aktiválódásához szükség van az Arp2 alegység treonin és tirozin aminosavainak a foszforilálására (LeClaire és mtsai. 2008) és bizonyos nukleációt elősegítő fehérjékkel (NPFs, Nucleation Promoting Factors) való kölcsönhatásra. A legtöbbet tanulmányozott NPF-ek a WASP/SCAR/WAVE és Cortactin fehérjecsaládokba tartozó fehérjék.

Ezek a faktorok olyan konformációs változásokat idéznek elő az Arp2/3 komplexben, amelyek az Arp2 és Arp3 alegységeket közelebb hozzák egymáshoz, így imitálva egy aktin dimer szerkezetét. Emellett, az NPF-ek a WH2 doménjeiken keresztül egy vagy két aktin monomert is megkötnék, ami kulcsfontosságú a nukleáció szempontjából, mivel az Arp2/3 komplex önmagában csak nagyon gyengén képes monomereket kötni. Ennek az utóbbi monomernek a bekötődésével létrejön egy olyan trimer, amely a nukleációs magok struktúrájához hasonlít, így elindulhat az aktin polimerizáció (Blanchoin és mtsai. 2000) (**8. ábra A**).

1.3.2.2. WH2 domén tartalmú aktin nukleációs faktorok

Ebbe a csoportba olyan fehérjék tartoznak, amelyek aktin monomereket kötnek meg, majd ezekből nukleációs magokat alakítanak ki. Ezek a fehérjék tandem ismétlődésként három vagy több G-aktin kötő domént tartalmaznak, amely a legtöbb esetben WH2 domént jelent, innen

a család elnevezése. A Spire, Cordon-bleu (Cobl), és Leiomodin (Lmod) fehérjecsaládok tartoznak ide, valamint néhány bakteriális nukleációs faktor (Qualmann és Kessels 2009) (**8. ábra A**). A WH2 domének jelenléte miatt ezek a fehérjék evolúciós rokonságban állnak a fent említett NPF-ekkel (Dominguez 2009), habár ezek a nukleációs faktorok nem kötődnek az Arp2/3 komplexhez, és az Arp2/3 komplexszel ellentétben ezek a faktorok nem elágazó aktin filamentumok képződését katalizálják.

A csoportból elsőként a Spire-t azonosították, mint a *Drosophila* peték és az embriók fejlődéséhez szükséges faktort (Manseau és Schüpbach 1989), később az aktin nukleációs képességét is kimutatták (Quinlan és mtsai. 2005). Az aktin polimerizációért felelős szekvencia négy tandem ismétlődő WH2 doménből és egy járulékos aktin monomer kötő linkerből áll (**8. ábra A**). Fontos megjegyezni, hogy az aktin összeszerelődés során a Spire együttműködik a forminokkal, ahogy ezt a *Drosophila* Spire és Capuccino fizikai kölcsönhatása bizonyította (Rosales-Nieves és mtsai. 2006). Végül, a Spire részt vesz a mikrotubulusok kötegelésében is, ami által közvetítő szerepet tölt be az aktin és a mikrotubulus rendszer közötti kölcsönhatásban (Quinlan és mtsai. 2007).

A Cobl fehérjét élesztő két-hibrid módszerrel azonosították patkány agyi extraktumból, ahol az ABP1-gyel (Actin-Binding Protein 1) és a Syndapin-nal mutatott kölcsönhatást. A Cobl eggyel kevesebb WH2 doménnel rendelkezik, mint a Spire. A polimerizáció létrejöttéhez mindhárom WH2 doménjére szükség van, annak ellenére, hogy a harmadik WH2 domén G-aktin iránti affinitása tízszer alacsonyabb, mint az első kettőé. Érdekes módon, az utolsó két WH2 domént összekötő linker hosszúsága szintén fontos az aktin összeszerelődés szempontjából. Ez arra enged következtetni, hogy az egymáshoz közeli helyzetű WH2 domének egy aktin dimert

hoznak létre, míg a távolabb eső WH2 domén egy harmadik monomerrel lép kölcsönhatásba, így hozva létre egy olyan trimer konfigurációt, amely elősegíti a polimerizációt (**8. ábra A**).

A WH2 csoport harmadik tagja, a Leiomodin fehérje szívizom szövetben található. Az Lmod egyetlen WH2 domént, és két másik típusú, a Tropomodulin (Tmod) fehérjében szintén előforduló aktin kötő domént tartalmaz (Chereau és mtsai. 2008). Az Lmod ezeknek az aktin kötő doméneknek a segítségével hozza létre a 3 monomerből álló nukleációs magot, amelyet a Tmod-hoz hasonlóan valószínűleg a mínusz vég felől stabilizál (**8. ábra A**). Említésre méltó, hogy *in vitro* körülmények között a Tropomiozin serkentette az Lmod nukleációs aktivitását, akárcsak a forminok esetében (Wawro és mtsai. 2007).

1.3.2.3. *A forminok*

A Formin-1-et először 1990-ben egérben azonosították, az elnevezés a *limb deformity (ld)* mutáció nevéből ered. Ez a mutáció homozigóta formában súlyos végtagfejlődési rendellenességeket eredményezett (Woychik és mtsai. 1990). Későbbi kísérletekben kimutatták, hogy az *ld* mutánsokra jellemző végtagfejlődési defektusok tulajdonképpen a szomszédos *gremlin* nevű gén mutációjához köthetők (Zuniga 2004). Ennek ellenére az *ld* gén időközben és később azonosított homológjaira a tudományos közösség megtartotta a „formin” elnevezést, mert bebizonyosodott, hogy ennek a fehérjecsaládnak a tagjai kulcsfontosságú szerepet játszanak számos sejten belüli aktin struktúra létrehozásában. Későbbi kísérletekben kimutatták, hogy a forminok jelen vannak az összes eukarióta szervezetben, ahol nagyszámú sejten belüli folyamat szabályozásában vesznek részt, beleértve a sejtpolarizáció, adhézio, osztódás és a sejtmozgás jelenségeit is (Evangelista és mtsai. 2003; Wallar és Alberts 2003). Az eukarióta szervezetek több formin gént tartalmaznak: a gombafajok 2 vagy 3, a *Drosophila* 6, az emlősök 15, néhány

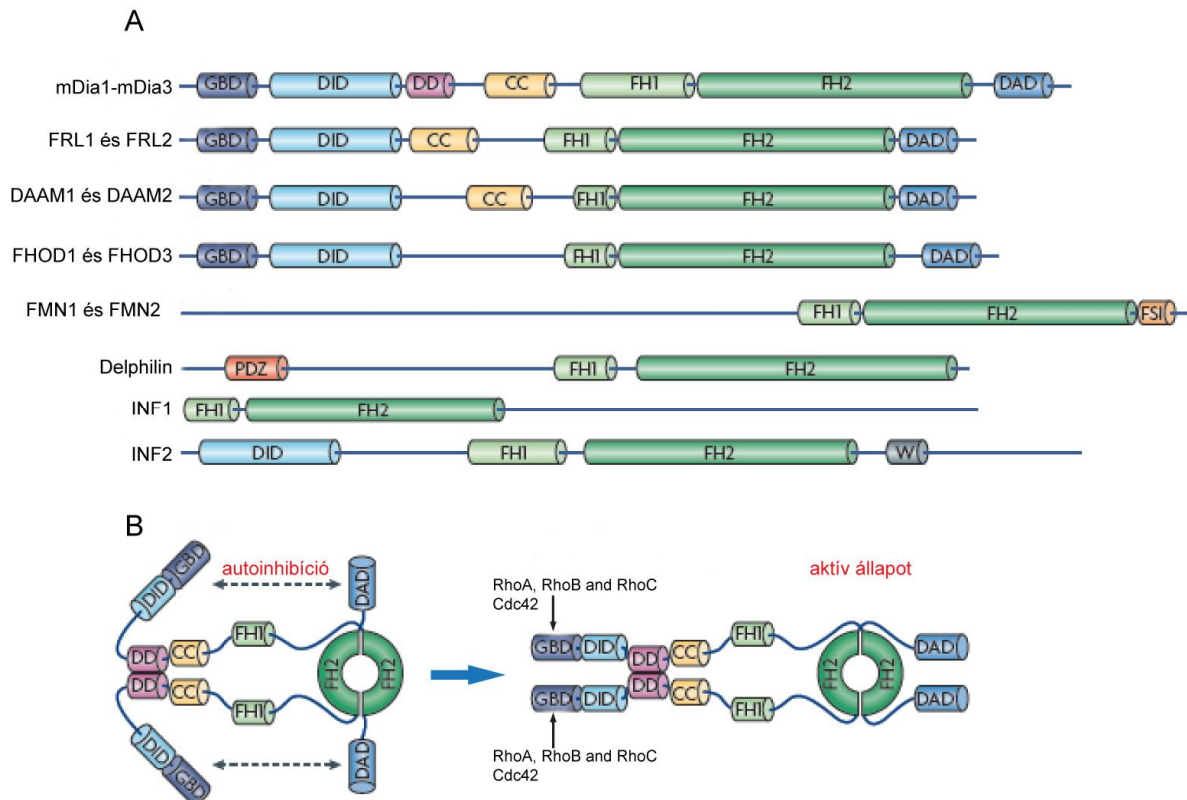
növényfaj pedig több mint 20 formin génnel rendelkezik (Higgs 2005; Grunt és mtsai. 2008; Chalkia és mtsai. 2008).

A forminok nagyméretű (120-220 kDa) fehérjék, számos konzervált domént tartalmaznak, melyeken keresztül sokféle fehérjével hatnak kölcsön. Akárcsak a WH2 domén tartalmú aktin nukleációs faktorok a forminok is az el nem ágazó (hosszanti lefutású) aktin struktúrák kialakulását katalizálják, közvetlenül nukleálva az aktin filamentumokat (Evangelista és mtsai. 1997; Pruyne és mtsai. 2002; Sagot és mtsai. 2002).

Minden formin fehérje legjellemzőbb doménje az FH2 (formin homológia 2) domén, amely az aktin filamentumok összeszerelődésében játszik szerepet. Az FH2 domének aminosav szekvenciájának elemzése alapján a metazoák formin génjeit hét alosztályba sorolták: Diaphanous (Dia); leukocitában azonosított formin-szerű fehérjék (formin-related proteins identified in leukocytes, FRLs); DAAM (Disheveled-associated activators of morphogenesis); formin homológia domént tartalmazó fehérjék (formin homology domain-containing proteins, FHOD); forminok (FMN); Delphinin; fordított forminok (inverted formins, INFs) (Higgs és Peterson 2005) **(9. ábra A)**.

A legjobban tanulmányozottak ezek közül a Diaphanous-szerű forminok (DRFs), ide tartoznak a Dia, a DAAM és az FRL forminok. Ezek szerkezeti szempontból két fő funkcionális régióra oszthatók: az N-terminális szabályozó régióra (amelynek a fehérje *in vivo* lokalizációjában van szerepe, és befolyásolni képes a C-terminális rész működését) és a C-terminális „aktív” régióra (amely elősegíti az aktin filamentum összeszerelődést, és bizonyos forminokban mikrotubulusokkal is kölcsönhat). A forminok N-terminális régiójában a GTP-áz kötő (GBD) és a Diaphanous inhibíciós (DID) domének után egy dimerizációs domén (DD) és a központi helyzetű coiled-coil domén (CC) következik. A DD és CC doméneknek az N-terminális

régió dimerizációjában van szerepük, mivel biofizikai módszerekkel sikerült kimutatni, hogy a formin fehérjék dimer formában aktívak (Li és Higgs 2005; Moseley és mtsai. 2004; Harris és mtsai. 2004; Harris és mtsai. 2006). Emellett a CC régiónak további szerepe lehet a forminok lokalizációjában a specifikus ligandokkal való kölcsönhatások során.



9. ábra A forminok doménszerkezete és a DRF forminok szabályozása. Az emlős formin családok doménszerkezete. Rövidítések: GBD, GTP-áz kötő domén; DID, diaphanous inhibíciós domén; DD dimerizációs domén; CC, coiled-coil domén; FH1 és FH2, formin homológia 1 és 2 domének; DAD, diaphanous autoregulációs domén; FSI, formin–Spire interakciós domén; PDZ, Postsynaptic density protein, Discs large, Zona occludens 1 domén; W, WASP homológia 2 domén. (B) A Diaphanous szerű forminok dimer formában aktívak, szabályozásukkor pedig az autoinhibíció a C-terminális DAD és az N-terminális DID domének kölcsönhatásával jön létre. A Rho fehérjecsaládba tartozó kis GTP-ázok GBD doménhez történő kapcsolódásával az autoinhibíciós kapcsolat megszűnik, így a formin aktív állapotba kerül. Forrás: Campellone és Welch 2010.

A C-terminális rész a DRF forminok esetében a Diaphanous autoregulációs domént (DAD) hordozza, amely az N-terminálison levő Diaphanous inhibíciós doménnel (DID) összekapcsolódva inaktív konformációt alakít ki. Speciális esetekben ez az autoinhibíció megszüntethető egy Rho kis GTPáznak az N-terminálison elhelyezkedő GTPáz-kötő doménhez

(GBD) való kötődésével (Li és Higgs 2003; Liu és mtsai. 2008a) **(9. ábra B)**. De egyre több bizonyíték szól amellett, hogy egyéb járulékos faktorok is közrejátszanak az aktiválásban. Emellett, úgy tűnik, hogy néhány formin képes aktiválni a Rho kötőpartnereit, ezáltal teremtvé meg a kölcsönös aktiváció lehetőségét (Habas és mtsai. 2001; Kitzing és mtsai. 2007).

Ugyancsak a C-terminális régióban található az aktin filamentum összeszerelődést megvalósító FH1-FH2 doménekből álló modul. A prolin-gazdag FH1 doménnek nincs stabil másodlagos szerkezete, viszont ismert, hogy kötőhelyeket tartalmaz a Profilin-aktin komplexek számára. A Profilin a sejtekben az ATP asszociált aktin monomereket köti meg (Kaiser és mtsai. 1999), következésképpen a Profilin-aktin komplexek az *in vivo* aktin összeszerelődés meghatározó építőkövei. A Profilin és az FH1 domén közötti kölcsönhatás kulcsfontosságú az aktin monomereknek az FH2 katalitikus régióhoz való szállításában (Kovar és mtsai. 2003; Yonetani és mtsai. 2008; Sagot és mtsai. 2002; Paul és Pollard 2009). A Profilinen kívül az FH1 domén kötőhelyül szolgálhat SH3 és/vagy WW doméneket tartalmazó fehérjék számára (Chang és mtsai. 1997; Evangelista és mtsai. 1997; Imamura és mtsai. 1997). Ez a domén, annak ellenére, hogy a Profilinen keresztül képes aktin monomereket megkötni, önmagában nem segíti elő az aktin nukleációt (Paul és Pollard 2009).

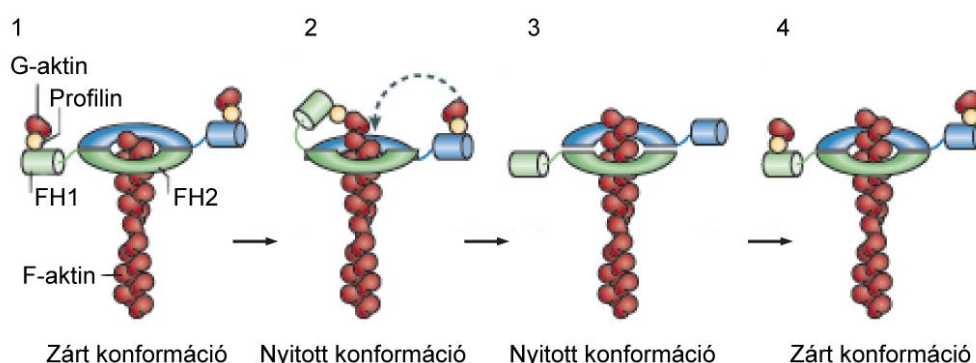
Az FH1 doménnel szomszédos, de annál jóval nagyobb méretű FH2 domén (kb. 450 aminosav) tekinthető a forminok katalitikus doménjének. Az FH2 doménre jellemző, hogy gyűrűszerű homodimereket alkot, amelyek körbeveszik az aktin filamentum gyorsan növekvő végét. A nukleációs lépés után a forminok az FH2 dimeren keresztül a plusz véghez kapcsolódva maradnak, így megvédik a filamentum végét a sapkázó (capping) fehérjék hozzákötődésétől, és emellett, ha szükséges, további monomerek beépülését segítik elő (ennek a jelenségnek a leírására az angol nyelvű szakirodalomban a „processive capping” kifejezést használják). Az

mDia1 és mDia2 esetében az FH2 domén a környező szekvenciákkal együtt a mikrotubulusokhoz is kötődik, és három mikrotubulus kötő fehérjével hat kölcsön: az end-binding protein 1-el (EB1), az adenomatous polyposis coli-val (APC), és a cytoplasmic linker protein 170-nel (CLIP170) (Wen és mtsai. 2004; Lewkowicz és mtsai. 2008; Bartolini és mtsai. 2008). Az FH2 homodimerek önmagukban is képesek katalizálni a tisztított aktin monomerek nukleációját *in vitro* körülmények között (Sagot és mtsai. 2002; Pring és mtsai. 2003), ugyanakkor a dimerizáció feltétlenül szükséges, mert azok a mutációk, amelyek megzavarják a dimerizációt, megszüntetik a polimerizációs aktivitást is (Moseley és mtsai. 2004; Copeland és mtsai. 2004; Xu és mtsai. 2004).

Az élesztő Bni1 (Xu és mtsai. 2004) és az emlős FH2 domének (Lu és mtsai. 2007; Shimada és mtsai. 2004) kristályszerkezetének tanulmányozása azt mutatta, hogy a dimerizáció során a két FH2 domén rugalmas, pányva-szerű aminosavak segítségével kötődik egymáshoz, és így alkot egy gyűrűszerű struktúrát. A Bni1 FH2 doménjét tetrametil-rodaminnal jelölt aktinnal együtt is sikerült kristályosítani, és azt figyelték meg, hogy a dimerizált FH2 gyűrű két aktin monomert köt, és ezeket olyan konformációba hozza, ami hasonlít az F-aktinra jellemző aktin dimerek szerkezetéhez (Otomo, Tomchick és mtsai. 2005). Ez arra utal, hogy az FH2 mediálta nukleáció magában foglalja az aktin dimerek stabilizációját is.

A fent említett FH2-aktin szerkezet, továbbá heterodimerikus FH2 mutánsok viselkedése alapján állították fel a forminok általános működési modelljét. Eszerint az FH2 dimer kezdetben két aktin monomert köt, mely a későbbiekben nukleációs magként szolgál a további aktin polimerizáció számára. Az FH2 dimer két különböző állapotban létezik a gyorsan növekvő végen. A zárt konformációban a további monomer beépülés nem lehetséges. A beépülés csak nyitott konformáció esetén történhet meg, és ez úgy valósul meg, hogy a plusz vég felé

elhelyezkedő hemidimer nyitottá válik és megtörténik az új aktin alegység hozzáadása, míg a mínusz vég felé eső hemidimer zárt állapotban található. A monomer beépülése után viszont az FH2 domén ismét zárt konformációt vesz fel. Az FH2 hemidimerek váltakozó nyitott és zárt állapotai eredményeképpen az FH2 dimer a beépülő monomereken való „továblépéssel” (stair stepping mechanism) lehetővé teszi az új aktin alegységek hozzáadását (Otomo és mtsai. 2005) (10. ábra).



10. ábra A forminok általános működési modellje. Az FH2 dimer az aktin-filamentumok plusz végéhez kötődik, az aktin polimerizációhoz szükséges monomereket az FH1 domén biztosítja a Profilin-G-aktin megkötésével (1). Az FH1 domén a Profilin-G-aktint a plusz vég közelébe szállítja, ahol az FH2 dimer egyik funkcionális fele építi be az aktin monomert a filamentum végére (2). A második FH2 domén megismétli ugyanezt a folyamatot (3). A formin zárt konformációja megóvjaa a filamentum véget a capping fehérjék hozzákötődésétől (4). Forrás: Campellone és Welch 2010.

Néhány formin a nukleációs és elongációs aktivitáson kívül más szerepet is betölt. Például az élesztő formin Bni1, az egér mDia2, FRL1, FRL2, FRL3, a *Drosophila* DAAM és az *Arabidopsis* FORMIN-LIKE 1 az aktin filamentumok kötegelésére is képesek (Moseley és Goode 2005; Harris és mtsai. 2006; Michelot és mtsai. 2005; Vaillant és mtsai. 2008; Barkó és mtsai. 2010). Az egér FRL1, INF2 és az *Arabidopsis* FH8-ról pedig kimutatták, hogy a filamentumok feldarabolásában vagy depolimerizációjában is szerepet játszanak (Harris és Higgs 2004; Chhabra és Higgs 2006; Yi és mtsai. 2005). A filamentumok kötegekbe rendezése az olyan párhuzamos lefutású aktin struktúrák kialakításakor lehet különösen fontos, mint amilyenek a filopódiumok és a stressz-rostok. A filamentum feldarabolásnak az aktin struktúrák gyors

átrendezésében lehet szerepe, de ez a formin szerepkörnek egy olyan aspektusa, amit *in vivo* körülmények között még nem vagy alig tanulmányoztak.

1.4. Aktin összeszerelődés és filamentumhossz szabályozás a harántcsíkolt izmokban

A harántcsíkolt izmok vékony filamentumainak elongációját patkány kardiomiocita és *Drosophila* primer embrionális sejtttenyészetekben is tanulmányozták, és a nem-izom sejtekkel ellentétben azt találták, hogy *in vivo* monomer beépülés nem csak a plusz végen történik, hanem a mínusz vég irányából is (Bai és mtsai. 2007; Littlefield és mtsai. 2001; Mardahl-Dumesnil és Fowler 2001; Pollard és mtsai. 2007). Ráadásul arra is fény derült, hogy a miofibrillumok fejlődése során jelentősen nagyobb az elongáció sebessége a mínusz végen, mint a plusz végen. Ez mindenképpen meglepő megfigyelés volt, hiszen a mínusz végi elongáció *in vivo* teljesen ismeretlen a szakirodalomban, és mivel eddig nem írtak le mínusz vég elongáló faktorokat, annak mechanizmusa egyáltalán nem nyilvánvaló. Mindemellett az elmúlt években több olyan fehérjét is jellemeztek, ami kapcsolatba hozható a miofibrilláris vékony filamentumok kialakulásával.

Az egyik első jelölt az Lmod aktin nukleációs faktor volt, amelyről kimutatták, hogy sejt kultúrákban nélkülözhetetlen szerepet játszik a miofibrillogenezisben. Az Lmod a vékony filamentumok mínusz végeinél lokalizálódik, az érett miofibrillumok M-vonalához közel (Chereau és mtsai. 2008). A Lmod fehérjeszintjének RNS interferenciával való csökkentése súlyos zavarokat okoz a szarkomer összeszerelődésben, de az α -aktinin periodikus elrendeződése az aktin filamentumok mentén fennmarad. Ezért valószínű, hogy egy másik aktin nukleációs faktor is szükséges a szarkomerogenezis kezdeti lépéseihez. Később azt is kimutatták, hogy sejtttenyésztett kardiomiocitákban az Lmod expressziós szintje az izomrostok kialakulásának későbbi stádiumában növekszik csak meg, és a fehérje csak a differenciálódott

miofibrillumokban halmozódik fel. Ezek alapján feltételezik, hogy az Lmod-nak csak a végső szarkomer szerkezet kialakításában és fenntartásában van szerepe, de nem szükséges a miofibrillogenezis kezdeti lépéseire (Skwarek-Maruszewska és mtsai. 2010).

A másik aktin összeszerelő faktor, amit kapcsolatba hoztak a szarkomerikus aktin filamentumok kialakulásával, a forminok közé tartozó Formin Homology 2 Domain Containing 3 (Fhod3) volt. Az emlős Fhod3 fehérjéről kimutatták, hogy kardiomiocita sejtenyészetben részt vesz a szarkomer szerveződésben. A Fhod3 fehérje szintjének RNS interferenciával való csökkentése a filamentáris aktin jelentős megfogyatkozását és a rendezett szarkomerikus struktúra felbomlását eredményezte. A Fhod3 azonban *in vitro* körülmények között még Profilin jelenlétében is gátló hatással volt az aktin polimerizációra. Másrészt a homozigóta *fhod3* mutáns egerek szívében is fejlődtek miofibrillumok, így a Fhod3 szerepe a miofibrillogenezisben hasonlónak tűnik az Lmod-hoz: valószínűleg nem a kezdeti lépésekben van szerepe, hanem inkább a már kialakult szerkezet fenntartásában (Taniguchi és mtsai. 2009; Kan-O és mtsai. 2012).

Az aktin nukleációs faktorokon kívül a *Drosophila* SALS (Sarcomere Length Shortening) fehérjét is kapcsolatba hozták az aktin filamentum növekedéssel. A SALS egy esszenciális fehérje, a *sals* mutánsok nagy része a lárvális fejlődési stádiumban elpusztul. Ezeknek a mutánsoknak az izmai normális számú, de jelentősen megrövidült szarkomerből állnak, ami arra utal, hogy bennük rövidebbek a vékony filamentumok, mint a vad típusban. Genetikai adatok alapján a SALS *in vivo* funkcionálisan antagonizál a mínusz vég sapkázó (lásd alább) Tmod fehérjével, ezáltal segítve elő a filamentum elongációt. Meglepő módon azonban, *in vitro* körülmények között a SALS kölcsönhatást mutat az aktinnal, de gátolja az aktin polimerizációt. Ezek alapján feltehetően ennek a fehérjének sincs szerepe a miofibrillogenezis kezdeti lépései

során (nem szükséges a szarkomerek kialakulásához), csak a szarkomerek növekedésében játszik szerepet (Bai és mtsai. 2007). A szarkomerikus aktin filamentumok képződésének a kezdeti lépéseken túl a hossz szabályozás is egy fontos eleme, hiszen a szarkomerek hosszát döntően az aktin filamentumok hossza határozza meg. A hossz-szabályozás vonatkozásában ismert, hogy a filamentum végeket sapkázó (capping) fehérjék tartják lezárva. Ezek megakadályozzák a további monomer beépülést, illetve disszociációt, ily módon stabilizálják a filamentumok hosszát. Az eddig leírt sapkázó fehérjék közül a CapZ a plusz, míg a Tmod a mínusz végeket képes lezárni (Au 2004). Irodalmi adatok alapján (Littlefield és mtsai. 2001) ez a két fehérje harántcsíkolt izmokban is képes kötődni az aktin filamentumok végéhez, és hozzájárulnak a vékony filamentumok hosszának szabályozásához.

Összefoglalva elmondható, hogy a szarkomerikus aktin filamentumok kialakulásáról és hosszának szabályozásáról már vannak ismereteink, de a kezdeti aktin összeszerelő faktor és a molekuláris mechanizmus egyelőre ismeretlen. Jelen dolgozatban arról számolok be, hogy a formin fehérje család egy másik tagjáról, a DAAM alcsalád *Drosophila* képviselőjéről sikerült bizonyítanunk, hogy szükséges a vékony filamentumok kezdeti összeszerelődéhez, és eredményeink alapján javaslatot teszünk egy új mínusz vég elongációs mechanizmusra. Saját egér sejt kultúrákban végzett kísérleteink és mások genetikai vizsgálatai alapján feltételezhető, hogy a DAAM alcsalád szerepe a miofibrillogenezisben evolúciósan konzervált. Az eredmények ismertetése előtt a bevezetés utolsó fejezetében áttekintem a DAAM alcsaládba tartozó forminok legfontosabb jellemzőit.

1.5. A DAAM formin alcsalád

A DAAM alcsaládba tartozó formin típusú fehérjéket először a citoplazmatikus foszfoprotein Dishevelled-like (Dvl) kölcsönható partnereként azonosították, innen ered az

elnevezésük is: Dishevelled associated activator of morphogenesis (Habas és mtsai. 2001). A Dishevelled (Dsh/Dvl) fehérje család tagjai a Wnt/Frizzled jelátviteli út jól ismert elemei. Különböző modellrendszereken végzett kutatások alapján tudjuk, hogy a Wnt ligandok által aktivált Frizzled receptorok több, sejten belüli szignál transzdukciós utat is aktiválhatnak. Ezek közül a β -katenin függő utat kanonikus Wnt/Frizzled jelátviteli útnak nevezzük, míg az úgynevezett szöveti polaritási vagy „planar cell polarity” (PCP) fehérjéktől függő útvonalat Wnt/PCP vagy nem-kanonikus útnak nevezzük (Komiya és Habas 2008). Ellentétben a Dsh fehérjével, ami mind a kanonikus, mind pedig a nem-kanonikus Wnt/Frizzled jelátviteli rendszer működéséhez szükséges, a DAAM fehérje család szerepe kizárólag a Wnt/PCP útvonal működéséhez köthető, de nem szükséges a kanonikus Wnt jelátvitelhez. Ahogy fentebb már utaltam rá, a DAAM alcsalád szekvencia homológia és működésmód alapján is a DRF alcsaládhoz tartozik. Ezek a forminok a DID és DAD doménjükön keresztül autoinhibícióval szabályozódnak, amit Rho GTPázok képesek megszüntetni. Az egér és humán DAAM fehérjék FH2 doménjének *in vitro* vizsgálatával kimutatták (Lu és mtsai. 2007, Yamashita és mtsai. 2007), illetve csoportunk Nyitrai Miklós (PTE, Biofizikai Intézet) kutatócsoportjával együttműködve a *Drosophila* DAAM biofizikai vizsgálatával megállapította, hogy a DAAM FH2 domén *bona fide* formiként viselkedik az aktin nukleációs és polimerizációs kísérletekben. Azt is sikerült megmutatnunk, hogy a dDAAM FH1 doménje az aktin összeszerelődés során kölcsönhat a Profilin-aktin komplex-szel (Barkó és mtsai. 2010).

Szekvencia analízis alapján a gerinces fajok genomja három DAAM ortológot kódol, amelyek kifejeződési mintáját egérben, karmos békában és csirkében is tanulmányozták. Az expressziós minta az embriogenezis során térben és időben is dinamikusán változik. Az expresszió a fejlődő központi idegrendszer (CNS) területén, a szomitákban, a dermomyotomok

szintjén és a szívben a legmagasabb az összes vizsgált fajban. Érdekes módon az embrionális CNS-en belül az agy, a gerincvelő és a retina területén a *Daam1* és a *Daam2* gének egymást kiegészítő génexpressziós mintázatot adnak (Kida és mtsai. 2004; Nakaya és mtsai. 2004). A DAAM fehérje család funkcionális jellemzése során azt találták, hogy a *Daam1*-nek kulcsszerepe van a Wnt/PCP jelátvitelben a *Xenopus* gasztruláció során. Később gerinces szövettényezeteken a DAAM-nak egy sor olyan, a sejtműködésben végzett szerepét tárták fel, ami összhangban van a forminok általános, a citoskeletális szabályozásban betöltött funkcióival. Ide tartozik a *Daam1* által a sertés-aorta endoteliális sejtek alakjának és elágazódásainak a szabályozása; részvétel a vérlemezkékben zajló RhoA-függő aktin összeszerelődésben (Higashi és mtsai. 2008); az endoteliális sejtek vándorlásának és proliferációjának a gátlása, és a mikrotubulusok stabilizációja ezekben a sejtekben (Ju és mtsai. 2010); a stressz-rostok kialakulásának és a centroszóma reorientációjának a szabályozása COS-7 és U2OS sejtekben (Ang és mtsai. 2010). Az *mDaam1* egér mutánsok vizsgálatával arra derítettek fényt, hogy ez a fehérje fontos szerepet játszik a szívfejlődésben és a szarkomerek kialakulásában. Elképzelhető, hogy a szívfejlődési rendellenességek eredendően bal-jobb aszimmetria zavarokat tükröznek, ami összhangban lenne azokkal a további megfigyelésekkel, melyek szerint a DAAM fehérjék hozzájárulnak az idegrendszeren (Lee 2012; Colombo 2013) és a bélrendszeren (Welsh, 2013) belüli aszimmetriák kialakításához csirke és zebrahal modellrendszerekben.

A fentiek alapján világos tehát, hogy a sejtvázas szabályozó fehérjék evolúciósan nagymértékben konzerváltak. Ezért a dDAAM fehérjével végzett kísérletek tovább bővíthetik az emlős DAAM és a vele rokon forminokra vonatkozó ismereteinket.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Drosophila* DAAM jellemzése során csoportunk megfigyelte, hogy a gén erős expressziót mutat a 12. embrionális stádiumban a fejlődő szívcső kardioblasztjaiban, majd később a fejlődő testfal izmokban is. Ezek után kimutattuk, hogy a fehérje jelen van az adult szívcsőben és az indirekt repülőizmokban is. Embrionális és adult korú egér izommetszetek immunfestése után azt tapasztaltuk, hogy a mDaam1 a *Drosophila* izmokban tapasztalt lokalizációs mintázathoz hasonló képet ad egér izmokban. Tekintve, hogy a szarkomerikus aktin filamentumok kialakulásának mikéntje munkánk kezdetén jórészt ismeretlen volt, előzetes eredményeink alapján úgy gondoltuk, érdemes részletesen is megvizsgálni milyen szerepet tölthet be a dDAAM fehérje a miofibrillogenezis során. Mivel a forminok a nem-elágazó, hosszú aktin filamentumok összeszerelődését katalizálják, és a harántcsíkolt izomsejtek egyik fő alkotóeleme éppen az ilyen típusú filamentum, mindenképpen elképzelhető volt, hogy egy formin családba tartozó fehérje kulcsszerepet játszik a vékony filamentumok összeszerelődésében. Első lépésként a dDAAM fehérje lokalizációját kívántuk még alaposabban vizsgálni a muslica indirekt repülőizmainak szarkomerjeiben. Szándékunkban állt a vizsgálatokat a vad típuson kívül kiterjeszteni a fehérje funkcióvesztéses mutánsaira, valamint fehérje túltermeléses mutánsokra is. Funkcióvesztéses mutánsok és RNS csendesítő konstrukciók segítségével terveztük vizsgálni, hogy van-e szerepe a dDAAM-nak az aktin filamentumok kialakulásában és a szarkomerek összeszerelődésében. További tervünk volt a dDAAM molekuláris funkciójának vizsgálata, és a dDAAM-mal együttműködő izomfehérjék azonosítása, genetikai interakciós kísérletek, illetve biokémiai kísérletek során.

Mindezek alapján reméltük, hogy a dDAAM működésének jobb megértése egyben a szarkomer összeszerelődés mechanizmusáról is értékes információkat szolgáltat majd.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A dDAAM mutáns izmok fenotípusa és élettani jellemzése

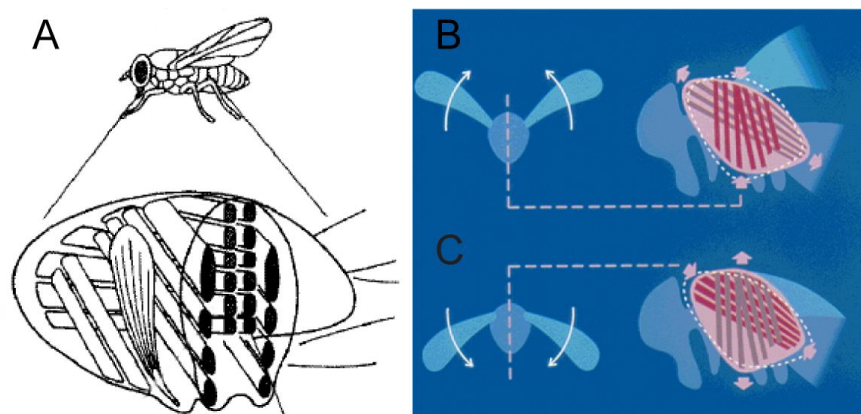
3.1.1. Az indirekt repülőizom szerkezete és fejlődése

Dolgozatom legnagyobb része a *dDAAM* génnek az indirekt repülőizom (Indirect Flight Muscle, IFM) fejlődése során betöltött szerepével foglalkozik. Emiatt a bemutatott eredmények jobb megértése érdekében szükségesnek tartom, hogy előljáróban ennek az izomnak a fejlődéséről és szerkezetéről egy rövid összefoglalót adjak.

A *Drosophila* IFM-et (11. ábra A) szerkezeti, élettani és fejlődési sajátosságai együttesen kiváló izom modellé teszik. Az alábbiakban ezeket az előnyöket ismertetném. Ebben az izomban a bábállapot túlnyomó részében a miofibrillumok egyidőben nagymértékű hossznövekedésen mennek keresztül. E növekedés minden stádiumában az izom szerkezete szigorúan rendezett, így a szerkezeti hibák könnyen detektálhatóak. Az izom állapota nem befolyásolja az életképességet, de a legkisebb változás is a szarkomer morfológiájában, amely még elektronmikroszkóppal sem detektálható, adult állapotban a röpképesség megszűnését vonhatja maga után. Ezeket a röpképtelen egyedeket pedig könnyen ki lehet szűrni egy egyszerű repülési tesztben. Ha a repülési tesztben nincs szignifikáns eltérés a vad típushoz képest, akkor értelmetlen molekuláris szintű vizsgálatokat végezni.

A kétszárnyúakban (*Diptera*), és így *Drosophilában* is, az IFM-nek egyedi a szerkezete. Anatómiailag a legjobban a gerinces szívizomra hasonlít (Maughan és Vigoreaux 1999), egyedi rostokra szedhető szét, és ily módon különbözik a tubuláris szerkezetű egyéb adult és lárvális rovarizmoktól. Arra a kérdésre, hogy ennek az izomnak miért alakult ilyen rendhagyóvá a szerkezete és a fejlődése, a válasz a muslica repülési mechanizmusában keresendő. A direkt szárnymozgató izmoknak csak a manőverezésben van szerepük repülés közben. A konkrét erőt,

ami a szárnyak felemeléséhez és lecsapásához szükséges, azt az indirekt repülőizom biztosítja. Ez az erő nem annyira a szárnyak alapjára hat, hanem a tor alakját változtatja. Az IFM két fő izomcsoportból, a dorzoventrális (DVM) és a dorzolongitudinális (DLM) izomcsoportból áll. A dorzoventrális izomcsoport összehúzódásával lapítja a tor kitinvázát és ezáltal a szárnyakat emeli. A dorzolongitudinális izomcsoport antagonistaként működik: a tor kitinvázának a felső részét emeli és ezáltal a szárnyak lefelé irányuló mozgását biztosítja (11. ábra B és C) (Fernandes és mtsai. 1991).



11. ábra Az IFM szerkezete. (A) Az adult állatok torának nagy részét az indirekt repülőizom nagy tömege tölti ki. Az IFM két antagonista izomcsoportból áll. A dorzoventrális (DVM) 7 izomrostból álló izomcsoport (B), összehúzódásával lapítja a tor kitinvázát és ezáltal a szárnyakat emeli. A 6 izomrostból álló dorzolongitudinális (DLM) izomcsoport (C) a tor kitinvázának a felső részét emeli és ezáltal a szárnyak lefelé irányuló mozgását biztosítja. Forrás: Maughan és Vigoreaux 1999; Vigoreaux 2001.

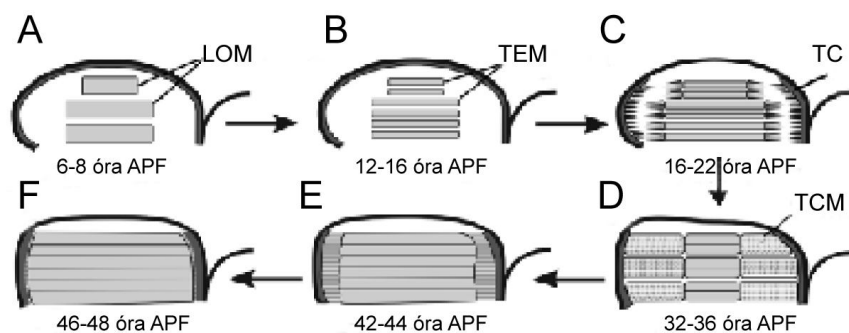
Az izom összehúzódása független az idegi impulzusoktól (aszinkron aktiválódású izom), az antagonista izomcsoportok folyamatosan ingerelt állapotban vannak, összehúzódásaikat az idegi utasításokon kívül a megfeszülésük is kiválthatja. Ebben az állapotban ezek az antagonista izomcsoportok egymást feszítve kölcsönös összehúzódási és elernyedési ciklusokon mennek keresztül, így érve el egy bizonyos összehúzódási frekvenciát. Ezt a frekvenciát nem az idegi impulzusok szabják meg, hanem a tor vázának a tulajdonságai. Így a szárnycsapások száma jóval magasabb értéket érhet el, mint ha folyamatos idegi impulzusok biztosítanák külön-külön az antagonista izmok összehúzódását (Bate és Arias 1993). Az izomműködésnek ez az aszinkron

módja kizárólag csak a rovaroknál előforduló „találmány”, a legnépesebb rovarrendek (*Diptera*, *Hymenoptera*, *Heteroptera* és *Coleoptera*) tagjaira jellemző, mint evolúciós adaptáció a magas frekvenciájú szárnycsapások eléréséhez. Tekintve, hogy a muslica átlagos szárnycsapási frekvenciája másodpercenként ~240, az IFM a leggyorsabban összehúzódó izmok közé tartozik (Maughan és Vigoreaux 1999; Swank és mtsai. 2006).

Az IFM fejlődése a mioblasztok vándorlásával kezdődik, melyek a korai bábban elvándorolnak a szárny imágókorong notum régiójából és megtelepednek a lárvális ferde izmok maradékán (Larval Oblique Muscles, LOM). Ezek a lárvális szomatikus testfal izmok mintaként szolgálnak a dorzolongitudinális izomcsoporthoz kialakulásához. A mioblasztok itt fuzionálnak és létrehozzák az IFM dorzolongitudinális és dorzoventrális izomcsoportját. A fúzió idején az izmok hosszanti növekedésen mennek keresztül, kitöltik a fejlődő tort, az ínsejtekhez kapcsolódnak, és ezek után a harmadára csökken a méretük. Erre az időszakra az adult szarkomer vázfehérjék magas expressziója jellemző. A szarkomer összeszerelődése ebben az időszakban történik, ezután az izmok újból megnyúlnak, az ínsejtek visszahúzódnak, az izmok kitöltik a rendelkezésükre álló teret (**12. ábra**), és kialakulnak a funkcionálisan aktív miofibrillumok.

A szarkomer fejlődésében a kritikus kezdeti időszak a bábállapot harmincadik és negyvenedik órája közötti időszakra esik. Ezután a szarkomerek száma már nem változik, csak a méretük növekszik, amíg el nem éri a ~3,2 μm végleges hosszúságot (Nongthomba és mtsai. 2004; Weitkunar és mtsai. 2014). Ennek megfelelően, látványos izomfejlődés zajlik le ebben az időszakban. Az IFM dorzolongitudinális izomcsoportjában a miofibrillumok ~310 szarkomerből állnak, a bábállapot kialakulásától számított 48 órás muslicákban a szarkomerek hossza ~1,7 μm , az általuk alkotott izom hossza ~500 μm . A fiatal adultokban ugyanaz a ~310 szarkomer már 3,2

μm hosszú, az izom hossza pedig eléri az $1000\ \mu\text{m}$ -t. Tehát a szarkomerek szintjén a növekedés majdnem kétszeres, és hogy ez megvalósulhasson, ahhoz a vékony és vastag filamentum rendszer egyidejű növekedésére van szükség a miofibrillum összeszerelődése során (Reedy és Beall 1993).



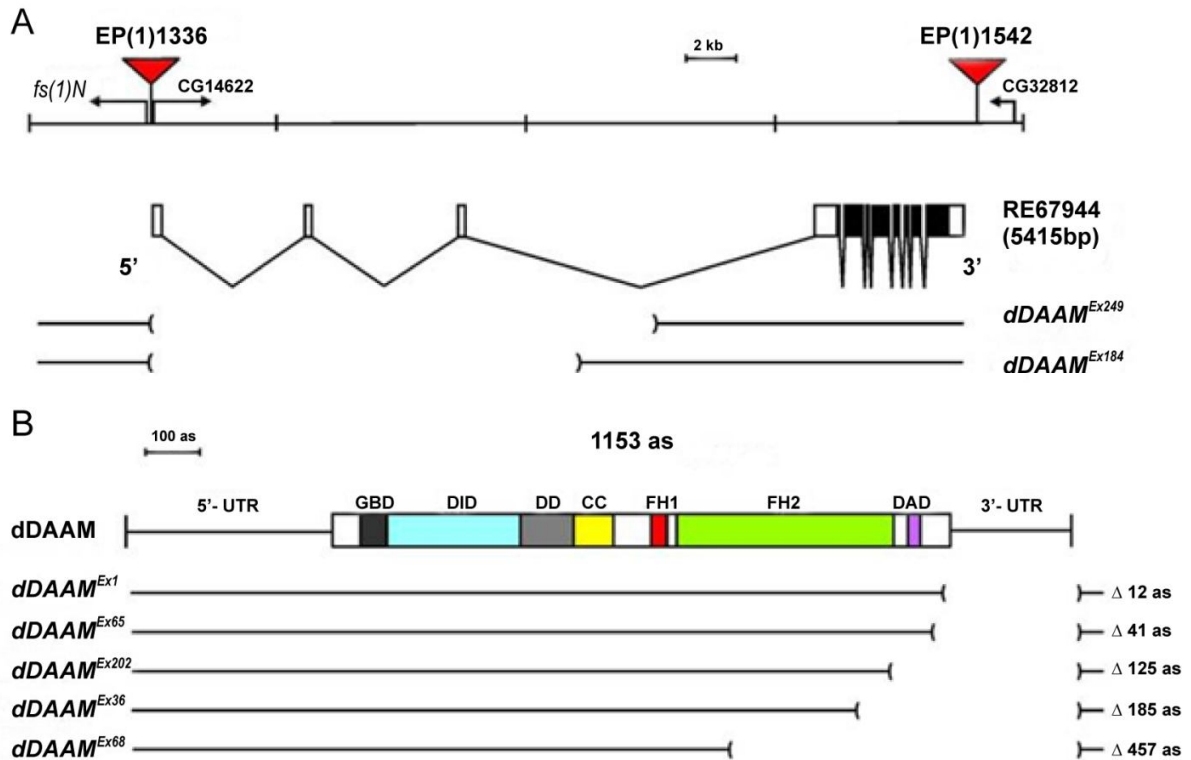
12. ábra A DLM fejlődése során bekövetkező rostképződés és sejtosztódásos folyamatok. (A) A DLM az olyan mioblasztok fúziójából jön létre, amelyek a LOM-on telepedtek meg. (B) A LOM nem megy át a teljes hisztolízisen és a továbbiakban templátként (TEM) szolgál. (C) Az IFM a mioblaszt fúziójának köszönhetően megnyúlik, és az ínsejtekhez (tendon cells, TC), kapcsolódik. (D) Az izomrostok megrövidülését követően elkezdődik a miofibrillogenezis. (E) Az egymásba kapcsolódó izom és ínnyúlványok (TCM) visszahúzódnak ahogy az izmok mérete növekszik, addig amíg a funkcionálisan aktív miofibrillumok (F) ki nem alakulnak. Forrás: Nongthomba és mtsai. 2004.

3.1.2. A dDAAM-nak az izomfejlődésben betöltött szerepét vizsgáló kísérletek előzményei

Az elmúlt néhány évben csoportunk egy formin alcsaládba tartozó fehérjének, a dDAAM-nak (Habas és mtsai., 2001) a funkcionális vizsgálatával foglalkozott. Szekvencia analízis alapján ez az egyetlen *Drosophila* DAAM ortológ, és a CG14622 jelű annotált génnek felel meg, ami az X kromoszóma csúcsán az 1F citológiai régióban található. A *Drosophila* genetikai adatbázis (FlyBase) több dDAAM transzkript lehetőségét felveti, ezek közül csoportunk elsősorban a CG14622-RB jelűre fókuszált, melyet az RE67944 jelzésű EST klón kódol. Megszekvenálva ezt a teljes hosszúságú cDNS klónt, egy 1153 aminosavból álló fehérje prediktálható. További vizsgálatok kimutatták, hogy az ORF valóban tartalmazza a forminokra jellemző konzervált doméneket, úgy mint az FH1, FH2, GBD és DAD domént (13. ábra A). A dDAAM funkcionális analíziséhez csoportunk funkcióvesztéses mutánsokat hozott létre két

transzpozon inszerciót EP(1)1336 és EP(1)1542 felhasználva, melyek a *dDAAM* lokusz közvetlen közelében találhatóak (**13. ábra A**). Ezen inszerciók remobilizációjával sikerült izolálni deléciós allélokat, melyek közül kettő a *dDAAM* 5' régiójára térképeződött, öt pedig a 3' régiót érintette.

A nagyméretű 5' deléciók csak 5' UTR exonokat és intronikus szekvenciákat érintenek. A 3' allélok jöllehet kisebb deléciókat (965-2538 bp) hordoznak, de a *dDAAM* ORF-et is érintik. A deléciók közül a legkisebb, a *dDAAM*^{Ex1} 12 aminosavat távolít el a prediktált fehérje C-terminális részéről, a legnagyobb, a *dDAAM*^{Ex68} pedig 457 aminosavat (**13. ábra B**). Mind az 5', mind a 3' deléciók letálisak homo-, illetve hemizigóta formában, kivéve a *dDAAM*^{Ex1}-et, amely homozigóta életképes és fertilis allél (a vad típushoz viszonyított életképessége viszont csak 17%-os). A letális 5' és 3' deléciók nem komplementálják sem egymást sem ezt a régiót átfedő deléciókat [*Df(1)AD11*, *Df(1)AC7*, és *Df(1)sta*]. Komplementálhatók azonban két transzpozíciós duplikációval [*Dp(1;3)sta* és *Dp(1;Y)Sz280*], amelyek hordozzák az 1F2-3 citológiai régiót, ahová a *dDAAM* lokalizálódik. A két legnagyobb deficiencia allél, a *dDAAM*^{Ex68} és a *dDAAM*^{Ex36} kivételével minden letális allél életképes a *dDAAM*^{Ex1} felett. Annak bizonyítására, hogy a letalitás a *dDAAM* fehérje hiányának köszönhető, létrehoztak olyan transzgenikus muslicákat, melyek hordozzák az UAS-FL-DAAM konstrukciót, amelybe a teljes hosszúságú RE67944 cDNS-t klónozták. Ezt a konstrukciót aztán menekítési kísérletben tesztelték. Ha az UAS-FL-DAAM-ot Actin-Gal4 vagy tubulin-Gal4 szabályozás alatt expresszálták mutáns háttéren, a letalitás menekíthető volt még a *dDAAM*^{Ex68} esetében is. Összegezve, ezek az eredmények bizonyították, hogy minden letális allél *dDAAM* allél, és ezek a mutációk nem érintenek más esszenciális genetikai elemet.



13. ábra A *dDAAM* gén szerkezete, a *dDAAM* homológia doménjei, és a deléciós allélok helyzete. (A) Az 1F2-3 citológiai pozícióban található a CG14622 annotációs számnak megfelelő egyetlen *Drosophila* DAAM ortológ. A funkcióvesztéses allélok előállítására használt két P elem, az EP(1)1336 és az EP(1)1542 pozícióit piros háromszögek jelzik. Ex249 és Ex184 a neve a két nagyméretű 5' delciónak. (B) A teljes hosszúságú *dDAAM* cDNS-e egy 1153 aminosavat tartalmazó fehérjét kódol, melyben megtalálhatóak a DRF forminokra jellemző homológia domének. Az ábra alján a 3' deléciók pozícióját tüntettük fel.

A funkcióvesztéses (Loss of Function, LOF) vizsgálatokat megkönnyítendő, csoportunkban előállítottak egy *T129M* nevű RNS interferencia konstrukciót is. Embriókon végzett RNS *in situ* hibridizációs kísérletek alapján a *dDAAM* fehérje több szövetben is kifejeződik.

Ezek a szövetspecifikus funkciókon kívül azt is észrevettük, hogy a gyenge hipomorf *dDAAM*^{Ex1} allélt hordozó, ezért hemizigóta formában is életképes adult hímek röpképessége gyengébb a vad típusnál. Mivel a röpképtelenséget leggyakrabban az IFM szerkezetében bekövetkezett változások okozzák, immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk tovább az izmot. Megállapítottuk, hogy a *dDAAM* fehérje az IFM szarkomerein belül a Z-korongok és az M-vonal környékén lokalizálódik. Mivel ez a lokalizációs eredmény egy érdekes, eddig nem

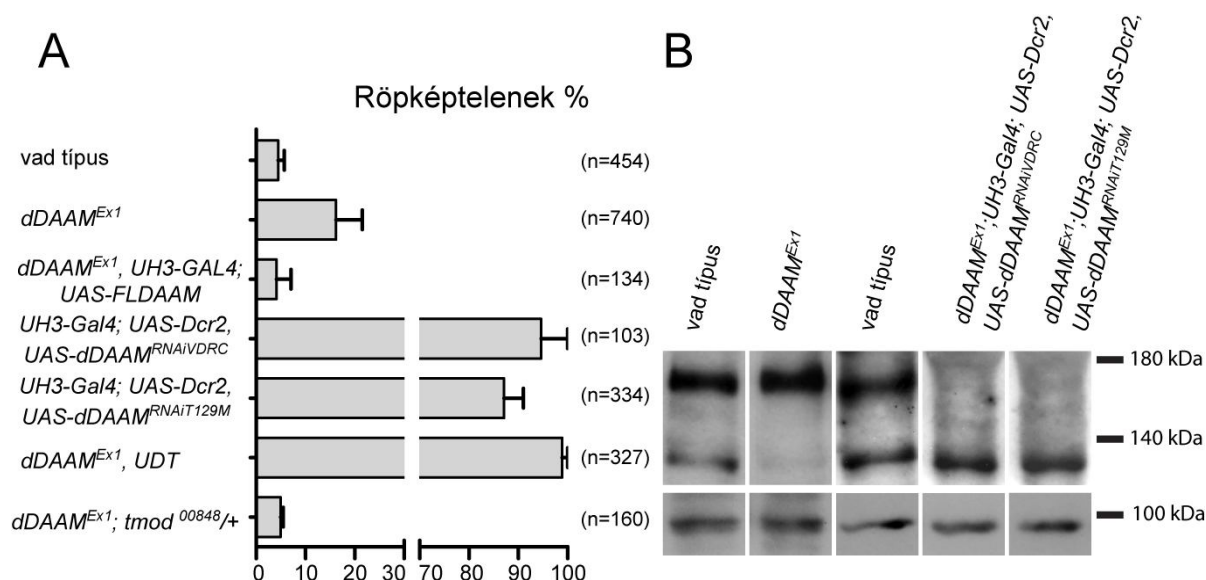
tanulmányozott szerepre utalt, elhatároztuk, hogy részletesebben is megvizsgáljuk, vajon mi módon vehet részt a dDAAM fehérje az indirekt repülőizom fejlődésében.

3.1.3. A dDAAM mutáció befolyásolja a röpképességet és az indirekt repülőizom fejlődését

A *Drosophila* DAAM forminnal végzett kísérleteink során kimutattuk, hogy a homozigóta életképes $dDAAM^{Ex1}$ -es allélt hordozó muslicák 16%-a röpképtelen szemben a vad típusnál tapasztalt 4,5%-os röpképtelenségi aránnyal. Ez a röpképtelenségi arány gyenge, moderált fenotípusnak számít, de ez nem meglepő adat egy hipomorf allél esetében. Mivel a $dDAAM$ null allélok homozigóta formában letálisak, úgy próbáltunk erősebb funkcióvesztéses fenotípusokat létrehozni, hogy RNS interferenciás kísérletekkel csökkentettük a dDAAM fehérje szintjét vad típusú és $dDAAM^{Ex1}$ -es állatokban, és így vizsgáltuk a röpképességben bekövetkezett esetleges változásokat.

Az RNS interferenciás kísérletekhez kétféle RNS interferencia konstrukciót használtunk. A *T129M* nevű konstruktot a csoportunk már korábban létrehozta ($RNSi^{T129M}$). A *KK102786* nevű RNS interferenciás konstrukciót pedig a bécsi RNS interferencia törzsgyűjteményből (VDRC) szereztük be ($RNSi^{VDRC}$). A két konstrukt a $dDAAM$ génről képződő mRNS nem átfedő részeit célozza meg. Az RNS interferenciás kísérletekhez indirekt repülőizom specifikus Gal4 meghajtó elemet (*UH3-Gal4*) (Katzemich és mtsai. 2012) és *UAS-Dicer2*-t használtunk. A Dicer2 túltermelése posztmitotikus sejtek esetén célszerű, mert szignifikánsan javítja az RNS interferencia hatékonyságát. (Dietzl és mtsai. 2007). Mindkét RNS interferenciás vonal használata erős röpképtelen fenotípust eredményezett: a *KK102786* konstrukt ($RNSi^{VDRC}$) esetében 94% míg a *T129M* ($RNSi^{T129M}$) vonal esetében 87% volt a röpképtelenek aránya. Végül a dDAAM fehérje szintet tovább csökkentettük az említett módon úgy, hogy $dDAAM^{Ex1}$ -es háttéren végeztük el az RNS interferenciát ($dDAAM^{Ex1}$, *UH3-Gal4*; *UAS-Dicer2*; *UAS-*

dDAAM^{RNSi-T129M}, rövidítve: *dDAAM*^{Ex1}, UDT). Ebben az esetben a röpképtelen muslicák aránya 98%-ra emelkedett (**14. ábra A**). A röpképtelen fenotípus erőssége megegyezett a *dDAAM* fehérje szintjének az IFM-ben tapasztalt csökkenésével mind a *dDAAM*^{Ex1}-es, mind pedig az RNS interferenciás genotípusú állatok esetében (**14. ábra B**). Western blot analízis segítségével a *dDAAM* fehérjeszintet vizsgálva az IFM-ben azt találtuk, hogy a *dDAAM*-nak két izoformája expresszálódik ebben az izomban: egy 130 kDa-os rövid, és egy 163 kDa méretű hosszú izoforma.



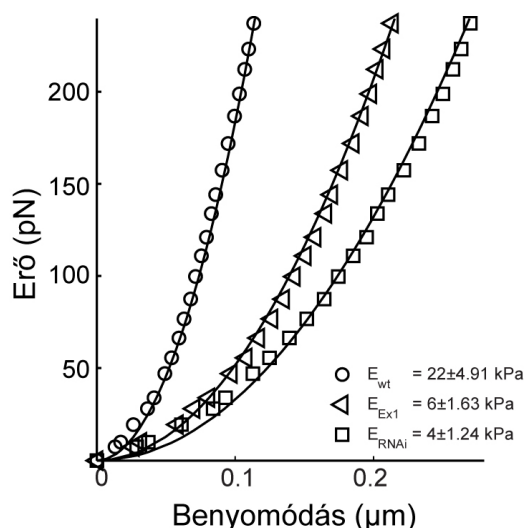
14. ábra A *dDAAM* befolyásolja a röpképességet. (A) A vad típusú és *dDAAM* mutáns legyek röpképességének mérése a megfelelő genotípusok feltüntetésével. Az oszlopok az átlagértéket ábrázolják, melyek fölött a szórások értéke található. (B) Western blot analízissel mutattuk ki, hogy a vad típusú IFM-ben kétféle *dDAAM* izoforma expresszálódik: egy 130 kDa és egy 163 kDa méretű izoforma. A hosszú izoforma nagyobb mennyiségben expresszálódik. A *dDAAM*^{Ex1}-es allélben a 130 kDa-os rövid izoforma szintje, míg az RNS interferenciás vonalakban a 163 kDa-os hosszú izoforma szintje csökken le számottevően. Belső kontrollként a glikogén-foszforyláz ellenanyagot használtuk (100 kDa).

A rövid izoforma méretben megfelel a Flybase által prediktált PB izoformának, míg a hosszú izoforma a mérete alapján a PD izoformának felel meg. Az **14. ábra B** paneljén látható, hogy a PD, hosszú izoforma nagyobb mennyiségben expresszálódik. A *dDAAM*^{Ex1}-es allélben a 130 kDa-os rövid izoforma szintjében mutattunk ki csökkenést, míg az RNS interferenciás vonalak esetében a 163 kDa-os hosszú izoforma szintjében sikerült nagymértékű csökkenést

kimutatnunk (**14. ábra B**). A $dDAAM^{Ex1}$ -es és az RNS interferenciás röpképtelen fenotípust menekíteni tudtuk mind a dDAAM-PB mind pedig a PD izoforma túltermelésével. A röpképtelenek aránya 4%-ot tett ki a $dDAAM^{Ex1}$ -es menekített hímek esetében, ami megegyezett a vad típusával, míg ez az érték a menekített $dDAAM^{Ex1}$, *UDT* esetében 7%-os volt.

3.1.4. Atomerő-mikroszkópiás mérések az indirekt repülőizom miofibrillumain

Az atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscope, AFM) alapelve: egy speciálisan kialakított tű alakú szondát atomi méretű lépésekkel mozgatunk a vizsgált felülettől igen kis távolságra, mintha csak egy miniatürizált lemezjátszótűvel tapogatnánk le a felületet. Egy mechanikus rendszer érzékeli az atomi vonzó és taszító kölcsönhatási erőket, a vele összeköttetésben lévő lézeroptikai rendszer jeleiből pedig rekonstruálható a felület atomi mintázata. Az atomerő-mikroszkóp képalkotása a felületet pásztázó tű és a felület atomjai között fellépő erő mérésén alapul. Az AFM tűjével atomi méretekben módosíthatjuk a felületet. A mechanikus rendszer, ami az atomi erőket érzékeli, arra is használható, hogy mikroszkopikus



szinten meg tudjuk mérni bizonyos anyagok rugalmasságát (Young modulusát).

Annak érdekében, hogy kiderítsük a *dDAAM* mutánsokra jellemző szerkezeti hibák befolyásolják-e az izom mechanikai tulajdonságait, olyan AFM elemzéseket végeztünk, amelyek során a miofibrillumok rugalmasságát mértük összehúzódtott állapotukban (15. ábra).

15. ábra A vad típusú és *dDAAM* mutáns miofibrillumok haránt irányú rugalmasságának mérése atomerő-mikroszkóp segítségével. Hogy a miofibrillumok mechanikai tulajdonságait jellemezni tudjuk, a haránt irányú rugalmasságukat a Young féle modulus segítségével számoltuk ki. Mintánként a különböző pontokon felvett több erő-benyomódás görbéből számolt átlagot, valamint a standard deviációt ábrázoltuk. A *dDAAM^{Ex1}* és a *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutáns miofibrillumok rugalmassága szignifikánsan alacsonyabb, $6 \pm 1,63$ kPa ($n=35$) illetve $4 \pm 1,24$ kPa ($n=15$), a vad típushoz: $22 \pm 4,91$ kPa ($n=25$) képest.

A miofibrillumok hosszanti irányú rugalmasságának a mérése adja a legpontosabb képet az izom mechanikai tulajdonságairól, viszont ez a módszer túlságosan idő és munkaigényes, ezen kívül külön felszerelést és szaktudást igényelt volna, ami az adott keretek között nem állt

rendelkezésünkre. Ezért a technikailag jóval könnyebben kivitelezhető haránt irányú rugalmassági méréseket végeztük el. Ezzel a módszerrel sikerült kimutatnunk, hogy a $dDAAM^{Exl}$ és a $dDAAM^{Exl}$, UDT mutánsok miofibrillumainak haránt irányú rugalmassága szignifikánsan alacsonyabb a vad típusénál. A Young modulusz értékei a következők: $6\pm 1,63$ kPa ($n=35$) a $dDAAM^{Exl}$ -es, $4\pm 1,24$ kPa ($n=15$) a $dDAAM^{Exl}$, UDT mutánsok valamint $22\pm 4,91$ kPa ($n=25$) a vad típus esetében.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy míg a konfokális mikroszkópiás elemzéssel a $dDAAM^{Exl}$ mutáns IFM csak moderált fenotípusos elváltozást mutatott, addig a rugalmassági mérésekből kitűnik, hogy az itt meghatározott érték sokkal közelebb állt a súlyos RNS interferenciás fenotípus esetében mért értékhez, mint a vad típuséhoz. A konfokális adatokat kiegészítve sikerült kimutatni, hogy ha látszólag a szerkezet nem is sokban változott, az még nem jelenti azt, hogy az izom mechanikai tulajdonságai súlyosabban ne károsodtak volna. A fenti eredményeinkből következik, hogy a $dDAAM$ funkció csökkenése maga után vonja az izom szerkezetének és mechanikai tulajdonságainak a gyengülését. Ezek alapján ez a formin típusú fehérje fontos regulátora az izomfejlődésnek, sokoldalúan befolyásolva az ecetmuslicákban a miofibrillum képződést.

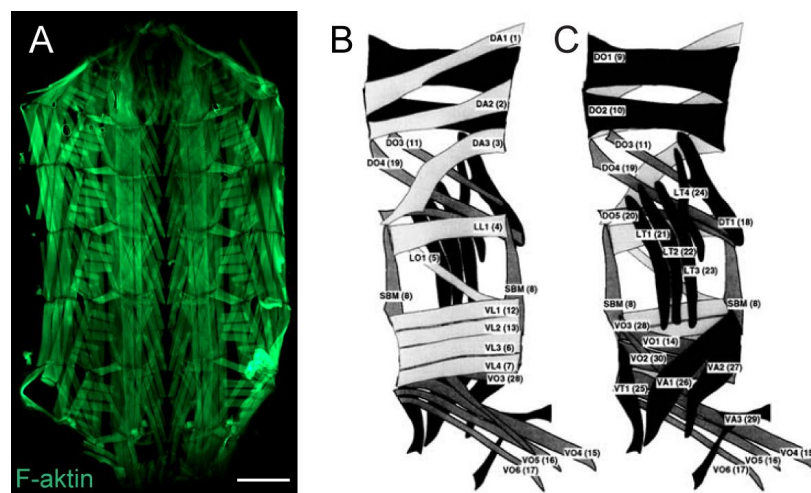
3.1.5. *A dDAAM hatással van a lárvális szomatikus izmok és a szívcső fejlődésére*

Az előbbi eredmények után arra a kérdésre szeretnénk volna választ találni, hogy a $dDAAM$ fehérjének az IFM fejlődésében betöltött szerepe általánosan érvényes-e minden más típusú izomra is. E célból a lárvális testfal izmokon és a lárvális szíven végeztünk kísérleteket.

3.1.5.1. *A lárvális szomatikus testfal izmok*

Az embrió fejlődésének 13. stádiumában a csírasáv visszahúzódása után egy bonyolult izom mintázat kezd kifejlődni az epidermisz belső oldalán. Ezek az izmok szincíciálisak,

harántcsíkoltak, és bizonyos helyeken kapcsolódnak a kialakuló lárva testfalához. Mindegyik izom rendkívül egyedi felépítésű, a szomszédjától megkülönböztethető a mérete, alakja, kapcsolódási pontjai és a beidegzése alapján. Habár az izmok mintázata első látásra bonyolultnak tűnik (**16. ábra A**), a mintázat szelvényenként ismétlődő egyszerűbb egységekre bontható. Az A2-A7 abdominális szelvények között egy szabályosan ismétlődő, 30 izomból álló minta látható (**16. ábra B, C**) (Bate 1990). Az A1-es szelvény egy kissé eltér ettől, mert csak 29 izmot tartalmaz. Az A8-as szelvényben pedig az izmok mintázata különbözik.



16. ábra A lárvális testfal izmok mintázata. Az (A) panelen egy L3-as stádiumú lárva testfal izomzata látható rodamin-falloidin jelölés segítségével. Ez a mintázat szelvényenként ismétlődő egyszerűbb egységekre bontható. Az abdominális szelvényekben, az A2-től az A7-ig, egy szabványos, 30 izomból álló minta látható belülről (B) és kívülről (C) nézve. A felső rész a dorzális résznek, míg az alsó a ventrális középvonalnak felel meg. A skála mérete: 250 μm . Forrás: Bate 1990.

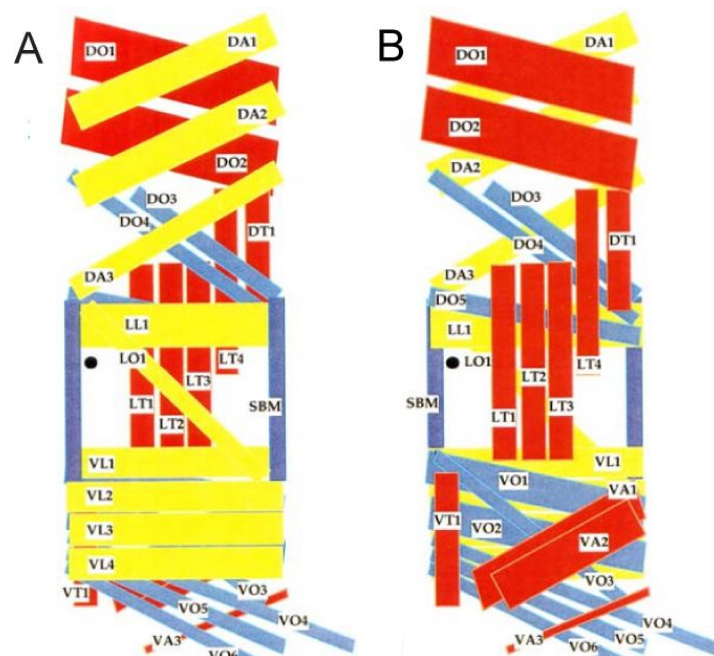
A megközelítőleg 5 napig tartó lárvális életszakasz során a testfal izmok látványos növekedésen mennek keresztül szarkomerek összeszerelődése és új miofibrillumok hozzáadása által, miközben a sejtmagvaik száma nem változik, bár ezek a sejtmagok DNS replikáción és növekedésen mennek keresztül (Bate és mtsai. 1991; Demontis és Perrimon 2009). A báb metamorfózisának kezdetén a lárvális izmok többsége hisztolízis útján lebomlik mielőtt az adult izmok differenciációja megtörténne, de néhányuk fennmarad, és ezek templátként szolgálnak az adult izmok összeszerelődésénél. Ebben az időszakban alakulnak ki az új adult izmok olyan mioblasztokból, amelyek differenciálatlanok maradtak az embrionális és a lárvális élet során (Currie és Bate 1991). A mioblasztok fúziójának a száma határozza meg a kialakuló izom egyedi

méretét, míg az izom alakját alapvetően az ínsejtekhez való kapcsolódása szabja meg. Az izmok nem csak ezekhez az ínsejteknek nevezett specializálódott epidermális sejtekhez kapcsolódhatnak, hanem egymáshoz is (Schnorrer és Dickson 2004), így alakítva ki a felnőtt izomzatra jellemző összetett mintázatot.

3.1.5.2. *A lárvális testfal izmok nevezéktana*

A Bate féle nomenklatúrában az izmokat három fő csoportra osztják: dorzális (dorsal), laterális (lateral) és ventrális (ventral) csoportokra. Ezeken belül az izmok tovább kategorizálhatók irányítottságuk szerint hosszanti (longitudinal), átlós (transverse), ferde (oblique) vagy hegyesszögű irányú (acute) izmokra. A „ferde” és „hegyesszögű” megnevezést annak az elkülönítésére használják, hogy ha az izom iránya a dorzális elülső résztől a ventrális hátulsó rész felé tart akkor „ferde”, míg ha a dorzális hátulsó résztől a ventrális elülső rész felé, akkor „hegyesszögű” irányítottságú. Mindegyik alkategórián belül, mint például „dorzális ferde” izmok, az izmokat a további megkülönböztetés érdekében számozzák is a dorzális résztől a

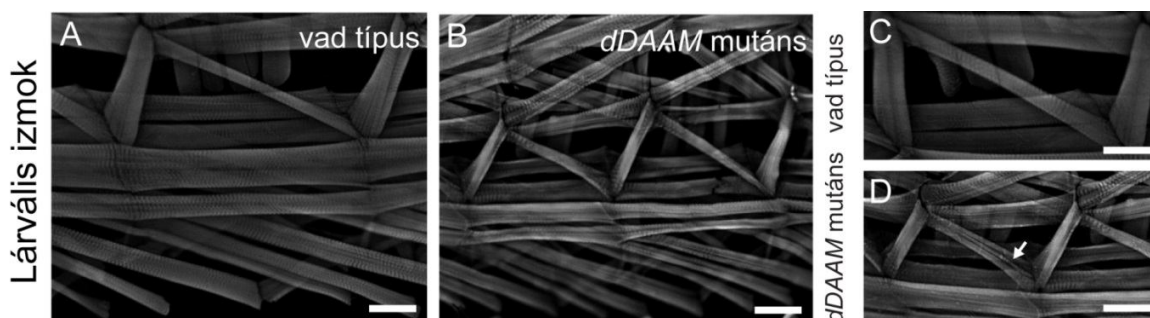
ventrális, valamint az elülső résztől a hátulsó felé (17. ábra) (Bate és Arias 1993).



17. ábra A lárvális testfal izmok nomenklatúrája. Az A2-től az A7-ig tartó abdominális szelvények sematikus ábrája belső (A) és külső (B) nézetben. A DA rövidítés a „dorsal acute”-nak, DO a „dorsal oblique”-nek, a DT a „dorsal transverse”-nek, az LL a „lateral longitudinal”-nak, az LO a „lateral oblique”-nek, az LT a „lateral transverse”-nek, a VA a „ventral acute”-nak, a VL a „ventral longitudinal”-nak, a VO a „ventral oblique”-nek, végül az SBM a „segment border muscle”-nek felel meg. Forrás: Bate és Arias 1993.

3.1.5.3. *dDAAM* mutánsokban megváltozik a lárvális testfal izmok szerkezete

dDAAM mutáns lárvák vizsgálata során azt találtuk, hogy a peterakástól (After Egg Laying, AEL) számított 72 órás *dDAAM*^{Ex68} –as null mutáns harmadik stádiumú (L3) lárvák testmérete és szomatikus testfal izomzata a vad típuséhoz hasonló. Azonban egy későbbi időpontban, 100 órával a kikelés után már nagy különbség volt a mutáns és a vad típusú lárvák testmérete között. A mutáns lárvák sokkal rövidebbek ($2,08 \pm 0,31$ mm; $n=30$) voltak a vad típusú lárvák testhosszához ($3,24 \pm 0,25$ mm; $n=30$) képest (**20. ábra A, E**). Annak ellenére, hogy a mutáns lárvákban súlyos szerkezeti változásokat a teljes testfal izomzat szintjén nem láttunk, a mutáns izmok kisebb méretűeknek bizonyultak, egyes izomrostokban szakadások voltak megfigyelhetők, és a miofibrillumok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése is sokkal lazább volt, mint a vad típusban (**18. ábra B, D**).

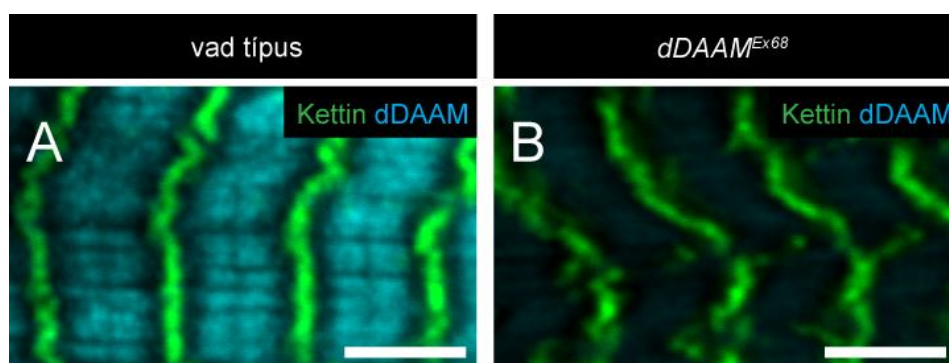


18. ábra A *dDAAM* mutáns lárvális testfal izmok általános szerkezete. Falloidinnal festett vad típusú (A, C) és *dDAAM*^{Ex68} null mutáns (B, D) lárvális testfal izmok. A mutáns izmok kisebbek, bizonyos izomrostokban szakadásos részek keletkeztek (a D panelen nyíllal jelöltük), és az általános felépítésüket tekintve az izmok sokkal lazább szerkezetűek a vad típushoz képest. A skála mérete: 100 μ m.

A megfigyeléseink számszerűsítésére kiválasztott 3-as számú ventrális hosszanti testfal izom (VL3) hossza a mutáns lárvákban 53%-kal, a szélessége pedig 38%-kal csökkent a vad típushoz képest (**20. ábra G, H**). A VL3-as izmok *dDAAM* mutánsokban megfigyelhető rövidülése két okra vezethető vissza, egyrészt a szarkomer hossz, másrészt a szarkomer szám is csökken ezekben a mutánsokban (**20. ábra I, J**). Az átlagos szarkomer hossz a vad típusú VL3-as izmokban a petéből való kikeléstől számított 100. óra után $6,2 \pm 1,6 \mu$ m ($n=477$ szarkomer),

ezzel szemben a *dDAAM* mutánsokban $3,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$ -re ($n=241$ szarkomer) csökkent. A *dDAAM* mutáns esetében a VL3-as izom szarkomer száma is lecsökkent ($30,1 \pm 2,1$; $n=8$) a vad típushoz ($39,7 \pm 4,3$; $n=12$) képest.

Ahhoz, hogy ki tudjuk mutatni, hogy az izomszerkezetben bekövetkező defektusok milyen fiziológiai elváltozásokkal járnak, a *dDAAM* mutáns lárvák mozgáskéességét is megvizsgáltuk egy lárvális mászási sebességet mérő tesztben. A strukturális elemzéssel összhangban a 72 órás AEL *dDAAM* mutáns lárvák egyenes vonalú mászásának a sebessége nem különbözött a vad típusétól (**20. ábra B**). Ez nagy valószínűséggel az anyai hatásra vezethető vissza, mert a *dDAAM*^{Ex68} –as lárvák ~10%-ában még 100 órával a petéből való kikelés után is kimutatható a fehérje (**19. ábra B**).



19. ábra A *dDAAM*^{Ex68} mutáns lárvák egy részében kimutatható a fehérje. (A-B) A fejlődő vad típusú 72 órás lárvális testfal izomban (A) jól látható kettős sávot alkot a *dDAAM* fehérje (ciánkékkel jelölve). Egy hasonló, de gyengébb

mintázatot figyelhetünk meg a *dDAAM*^{Ex68} –as mutáns lárvák ~ 10%-ában (B). A kettin (zöld) a Z-korongokat jelöli. A skála mérete: 5 μm .

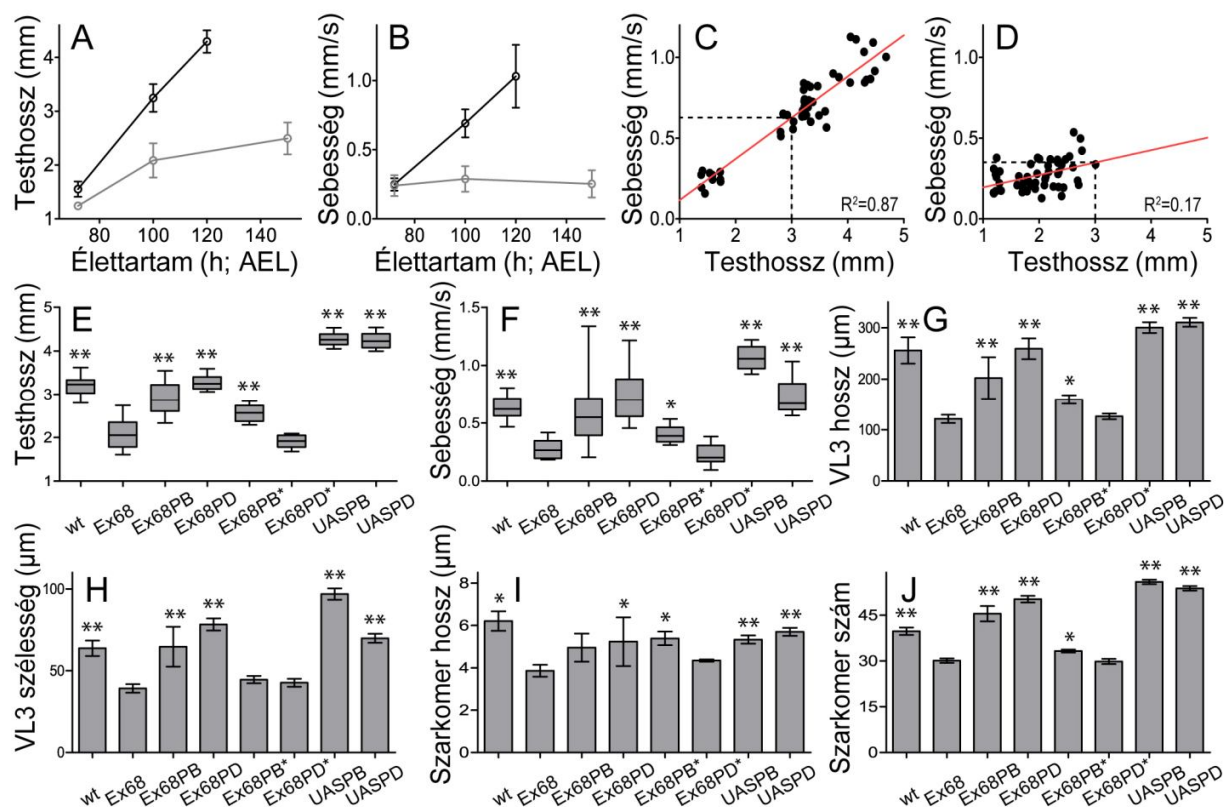
A 100 órás mutáns lárvák sebessége azonban ~60%-kal csökkent a vad típushoz képest (**20. ábra B**). Annak ellenére, hogy szoros összefüggés van a lárvák testhossza és mászási sebessége között, a *dDAAM* mutáns lárvák jóval lassabban mozogtak, mint ahogy csökkent méretük indokolta volna (**20. ábra C, D**). A menekítési kísérletek, amelyekben az általános izomdriver *Dmef2-Gal4* segítségével fejeztettünk ki különböző *UAS-DAAM* konstrukciókat, igazolták, hogy a megfigyelt fenotípusok a *dDAAM* funkció hiányának tulajdoníthatóak.

A fent említett menekítési kísérleteket külön elvégeztük mindkét izoformával. Az *UAS-DAAM-PB* expresszió a *dDAAM^{Ex68}*-as lárvák sebességvesztését csak részben, míg a testhosszát és izomméretét majdnem teljes mértékben menekíteni tudta. Az *UAS-DAAM-PD* expressziónak pedig sikerült majdnem teljesen helyreállítani a vad típusra jellemző testhossz és sebesség értékeket (**20. ábra E-H**). Ráadásul a PB és PD izoformák izom-specifikus túltermelése nem csak a lárvális izom károsodásait menekítette, hanem részben képes volt a *dDAAM^{Ex68}*-as null mutáns lárvák életképességét is egészen az adult stádiumig menekíteni (a túlélők aránya a vad típushoz képest 3% a PB, 6,1% a PD izoforma által menekített muslicák esetében).

Ezek után a mutáns menekítési kísérleti rendszert felhasználva azt a kérdést vizsgáltuk, hogy a dDAAM fehérje aktin összeszerelő aktivitásának van-e lényeges funkcionális szerepe a fehérje *in vivo* működésében. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a vad típusú konstrukciókkal ellentétben az aktin polimerizálásra képtelen mutáns formák, az *UAS-DAAM-PB^{I732A}* és az *UAS-DAAM-PD^{I1042A}*, melyek a Bni1 élesztő formin fehérje FH2 doménjét érintő I1431A mutációt utánozzák (Xu és mtsai. 2004), nem menekítették a fenotípust (**20. ábra E-J**). Sőt, az *UAS-DAAM-PD^{I1042A}* mutáns háttéren túltermelve domináns negatív formaként viselkedett a testhossz és a sebesség menekítése esetében. Azaz, a testhossz és sebesség értékei alacsonyabbak voltak a *dDAAM^{Ex68}*-as mutánsénál. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a forminok csakis dimerként működőképesek és mind a fehérje N-terminális fele, mind az FH2 domént hordozó C-terminális fele képes dimerizálódni, illetve részt vesz a dimerizációban (Otomo, Tomchick és mtsai. 2005; Rose és mtsai. 2005; Shimada és mtsai. 2004; Xu és mtsai. 2004). Ezek alapján az várható, hogy az aktin polimerizációra képtelen mutáns forma is alkothat dimert egy endogén teljes hosszúságú fehérjével, ami azonban egy inaktív heterodimer lesz, hiszen a formin aktivitás szempontjából esszenciális FH2 dimernek csak az egyik tagja lesz működőképes. Tekintve, hogy

ilyen heterodimerek képződése egyben a vad típusú fehérje termék szintjének csökkenéséhez vezet, a domináns negatív hatás érthetővé válik. A fenti adatok tehát azt igazolják, hogy a *dDAAM*-nak a lárvális izomszerkezet és motilitás kialakításában betöltött szerepe a fehérje aktin összeszerelő aktivitására vezethető vissza. Úgy tűnik, hogy a két izom-specifikus *dDAAM* izoforma, ha nem is teljes egészében, de részben redundáns szerepet játszik a lárvális izmok fejlődésében.

A mutáns háttéren végzett kísérleteken kívül a *dDAAM* konstrukciók vad típusú genetikai háttéren való túltermelését is elvégeztük. Figyelemre méltó módon az *UAS-DAAM-PB* és az *UAS-DAAM-PD* vad háttéren végzett izom-specifikus túltermelése a vad típusú lárvák testhosszánál szignifikánsan hosszabb lárvákat eredményezett. Az *UAS-DAAM-PB*-vel végzett túltermelés esetében ez az érték: $4,26 \pm 0,15$ mm; $n=10$; az *UAS-DAAM-PD*-nél: $4,24 \pm 0,19$ mm; $n=10$, szemben a vad típusnál mért $3,24 \pm 0,25$ mm; $n=30$, értékkel. A túltermelések hatására kimutatható volt a VL3-as izmok meghosszabbodása, annak ellenére is, hogy mindkét esetben kissé rövidebb átlagos szarkomer hosszt mértünk, mint a vad típusnál (**20. ábra E, G, I**). Ezeknek az izmoknak a meghosszabbodásához az vezetett, hogy a szarkomerek száma szignifikánsan megnőtt a vad típushoz képest. A vad típusban a szarkomerek száma: $39,7 \pm 4,3$; $n=12$, az *UAS-DAAM-PB* túltermelésénél $56 \pm 2,8$; $n=14$, míg az *UAS-DAAM-PD*-nél ez az érték $54 \pm 2,5$; $n=12$ (**20. ábra J**).



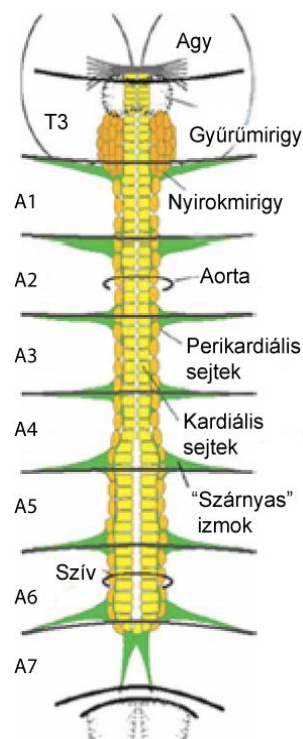
20. ábra A lárvális testfal izmok strukturális és funkcionális analízise. A lárvális életkor és a testhossz közötti összefüggés (A), és a lárvális életkor és mászási sebesség közti összefüggés (B) a vad típusú (fekete vonallal jelölt), és a *dDAAM^{Ex68}* mutáns (szürke vonallal jelölt), lárvák esetében. A lárvális testhossz és mászási sebesség közötti összefüggés a vad típusú (C), és a *dDAAM^{Ex68}* mutáns (D) lárvák esetében. A lárvális testhossz (E), mászási sebesség (F), a VL3-as izom hossza (G), szélessége (H), valamint az átlagos szarkomer hossz (I) és az össz szarkomer szám (J) adatainak ábrázolása a 100 órás AEL lárvákban a következő genotípusok szerint: wt (vad típus), Ex68 (*dDAAM^{Ex68}*), Ex68PB (*dDAAM^{Ex68}; DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PB*), Ex68PD (*dDAAM^{Ex68}; DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PD*), Ex68PB* (*dDAAM^{Ex68}; DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PBI732A*), Ex68PD* (*dDAAM^{Ex68}; DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PDI732A*), UASPB (*DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PB*) and UASPD (*DMef2-Gal4; UAS-dDAAM-PD*). Az I-N paneleken az oszlopok átlagértékeket ábrázolnak a szórások feltüntetésével. A statisztikai szignifikancia érték: * esetén $0,05 > p < 0,001$; ** esetén $p \leq 0,001$. A vad típusú és a menekítési kísérletek adatait mindig a *dDAAM^{Ex68}* mutáns adatokhoz hasonlítottuk, a kivételeket a szövegben jeleztük.

A fent említett strukturális változások tehát majdnem azonosak voltak mindkét izoforma túlermelése esetén. Viszont megemlítendő, hogy míg a PB izoformát túlermelő lárvák sokkal gyorsabban mozogtak (~55%-kal gyorsabban) a vad típusú társaiknál (20. ábra F), addig a PD izoformát túlermelő lárvák mozgása csak ~5%-kal volt gyorsabb, tehát szignifikánsan nem különbözött a vad típustól (20. ábra F). Ezen kívül megfigyeltük, hogy annak ellenére, hogy a PB és PD izoformát túlermelő lárvák testhossza nem különbözött lényegesen, a PB-t túlermelő

lárva VL3-as izma szignifikánsan szélesebb volt, mint a PD-t túltermelő lárvaé. Ezek alapján a dDAAM izoformák szintjének emelkedése önmagában elégségesnek tűnik a szarkomer szám növeléséhez, de a megfelelő szarkomer hossz eléréséhez szükség lehet a kétféle izoforma közötti együttműködésre és a kettő közötti arány pontos szabályozására is, ami erősíti azt, hogy csak részben átfedő a funkciójuk.

3.1.5.4. *A lárvalis szívcső szerkezete*

Drosophila lárvaiban a gerincesek szívével analóg szerv a szívcső. Ez egy mezodermális sejtekből álló cső alakú képlet, amely dorzálisan az epidermisz középvonala alatt fut az A7-es szelvénytől a fej felé, és a két agyfélteke között ér véget. Az A4/A5-ös szelvényhatártól hátrafele kiszélesedő részt nevezik „szívnek”, ez a szívcső összehúzódásra képes része (**21. ábra**). Az A1-es és A7-es szelvények között a szívcső kétféle sejtéből áll: a kardiális sejtekből, melyek a szívcső belső, izmos falát alkotják, és a hozzájuk csatlakozó külső, perikardiális sejtekből. A



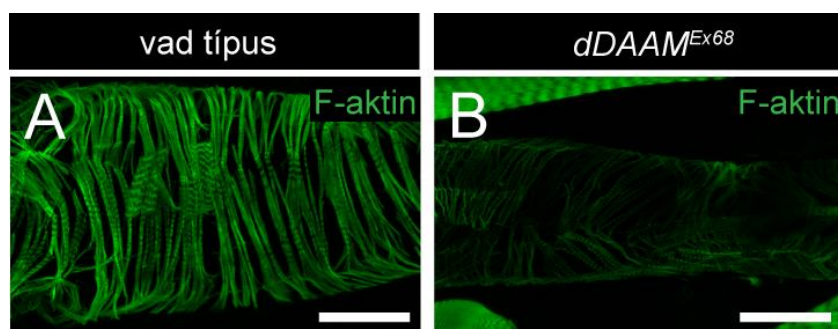
perikardiális sejteket helyhez kötött makrofágoknak tartják (Rizki és Rizki 1978). A lárvalis szív falát a testtengelyhez képest spirális lefutású vékony miofibrillumokból álló réteg alkotja. A szívcső falában párosával oldalsó billentyűk (ostia) helyezkednek el, melyeken keresztül az elernyedési fázisban a hemolimfa beáramlik. Az A4/A5-ös szelvényhatártól előbbre eső keskenyebb részt aortának hívják. Az aortát a szívtől a kardiovaszkuláris billentyű választja el.

21. ábra A lárvalis szívcső szerkezete Ezen a sematikus ábrán látható a szívcső és a hozzá tartozó izmok. Baloldalt a megfelelő szelvények vannak feltüntetve. Forrás: Mandal és mtsai. 2004.

Ezen kívül, hét pár legyező alakú izom, úgynevezett „szárnyas” izom is kapcsolódik a szívhez. Ezek a szívtől távolodva fokozatosan vékonyodnak és végül az epidermiszben érnek véget. Szerepük a szívnek a lárvális testfalhoz való rögzítése. Kapcsolódási pontjaik a torakális (T) 3-tól az A7-esig terjedő részen a szelvényhatároknál találhatók, és egy további izom pár a szív hátulsó végét rögzíti az A7-es szelvény dorzális epidermiszéhez. Az A1-es szelvénytől előbbre az aorta egyszerű csökként folytatódik, és ott nagy valószínűséggel csak kardiális sejtekből áll. Áthalad az agyi komisszúrákon és a gyűrűmirigytől körülvéve ér véget (**21. ábra**) (Molina és Cripps 2001; Bate és Arias 1993).

3.1.5.5. *A dDAAM funkcióvesztéses mutáns szívcső fenotípusa*

A $dDAAM^{Ex68}$ mutánsok lárvális szívcsővének mérete kisebb volt a vad típuséhoz képest (~40%-os átmérő csökkenés). A 100 órás vad típusú lárvákban a szívcső legszélesebb részén mért átmérő: $100,33 \pm 7,39 \mu m$; $n=9$. Ezzel szemben a $dDAAM^{Ex68}$ mutánsokban ez az érték: $60,44 \pm 6,18 \mu m$; $n=9$, és a szívcső F-aktin szintje is kevesebbnek látszik (**22. ábra**). Számos mutáns miofibrillum vékonyabbnak tűnik a vad típusnál, és az orientációjuk gyakran eltér a



normálistól (**22. ábra**).

22. ábra A $dDAAM$ hatással van a szívcső fejlődésére. Vad típusú (A) és $dDAAM^{Ex68}$ mutáns (B) lárvális szívcsövek F-aktin immunhisztokémiai festése rodamin-falloidinnal, (zölddel jelölve). A vad típushoz viszonyítva a $dDAAM^{Ex68}$ -as mutáns szívcsővének átmérője

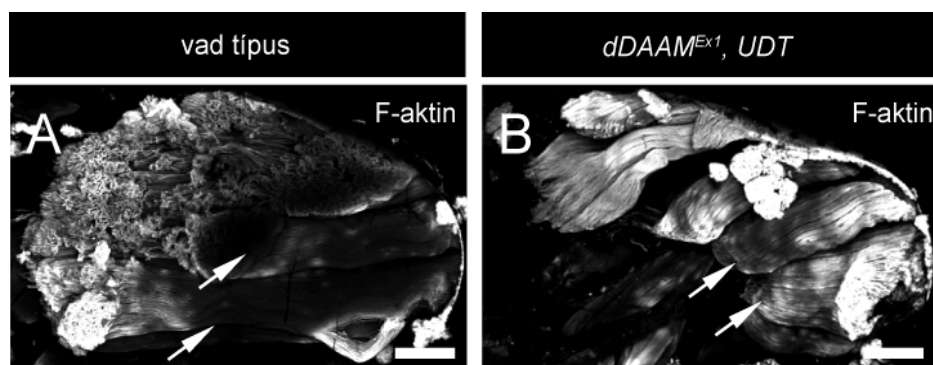
kisebb, F-aktin tartalma kevesebb. Ezenkívül, a mutáns miofibrillumok vad típusú megfelelőiknél vékonyabbnak tűnnek és orientációjukban is különböznek. A skála mérete: $40 \mu m$.

Ezek a megfigyeléseink azt sugallják, hogy a *dDAAM* forminnak kulcsszerepe van a *Drosophila* izomfejlődésében, hatása nem csupán az IFM-re korlátozódik, hanem minden fontosabb izomtípusban és fejlődési stádiumban megnyilvánul.

3.2. A *dDAAM* hiányos miofibrillumok vizsgálata

3.2.1. A *dDAAM* hiányos IFM szarkomerikus fenotípusa

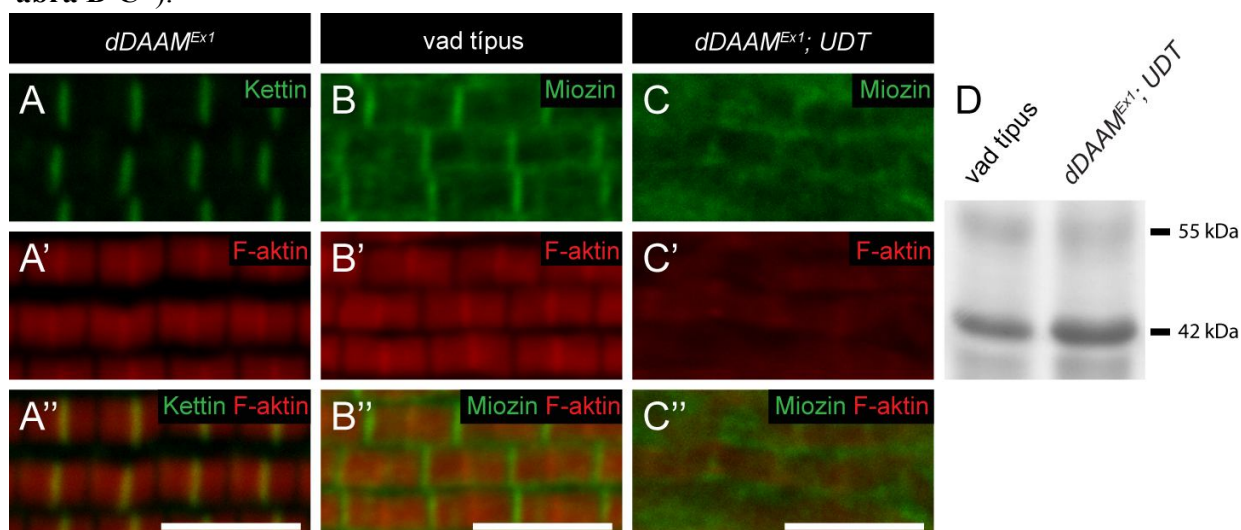
Következő lépésként immunhisztokémiai módszerekkel próbáltuk meghatározni azokat az IFM szerkezetében bekövetkezett változásokat, amik a *dDAAM* mutánsokban a röpképtelenséget okozhatták. A vad típusú vagy a szülői kontrollként használt *UH3-Gal4; UAS-Dicer2* genotípusú állatokban az IFM-ben rendkívül szabályos szarkomer szerkezet figyelhető meg. Immunhisztokémiai festéseknél rodamin-falloidin segítségével az F-aktin kötegeket lehet jelölni, míg Z-korong markerként anti-Kettin ellenanyagot használtunk. A szarkomerek hosszát illetően minden esetben, az állat méretétől függetlenül, $\sim 3,2 \mu\text{m}$ -t mértünk az adult legyek IFM-jében, hímekben és nőstényben egyaránt. A röpképtelen *dDAAM^{Ex1}*-es mutánsok IFM-je moderált fenotípust mutatott, ahogyan ez egy gyenge hipomorf alléltól várható. Csak a miofibrillumok $\sim 25\%$ -ban találtunk fenotípust, itt a szarkomerek hossza $\sim 19\%$ -kal volt rövidebb a vad típusnál, a miofibrillumok átmérője pedig $\sim 17\%$ -kal volt kisebb (24. ábra A).



23. ábra *dDAAM* mutáció hatása az IFM izomrostjainak a morfológiájára. (A-B) Konfokális mikroszkópiás kép az IFM struktúrájáról a vad típusú (A) és *dDAAM^{Ex1}, UDT* mutáns (B) esetében. Ezeknek a szagittális tormetsze-teknek az

esetében rodamin-falloidint használtunk az izmok F-aktinjának a jelöléséhez. Megfigyelhető, hogy a mutáns dorzolongitudinális izmok (DLM) rostjai rövidebbek (nyilakkal jelöltük) és vékonyabbak a vad típusnál, és az izmok egy része elsorvadt. A skála mérete: $100 \mu\text{m}$.

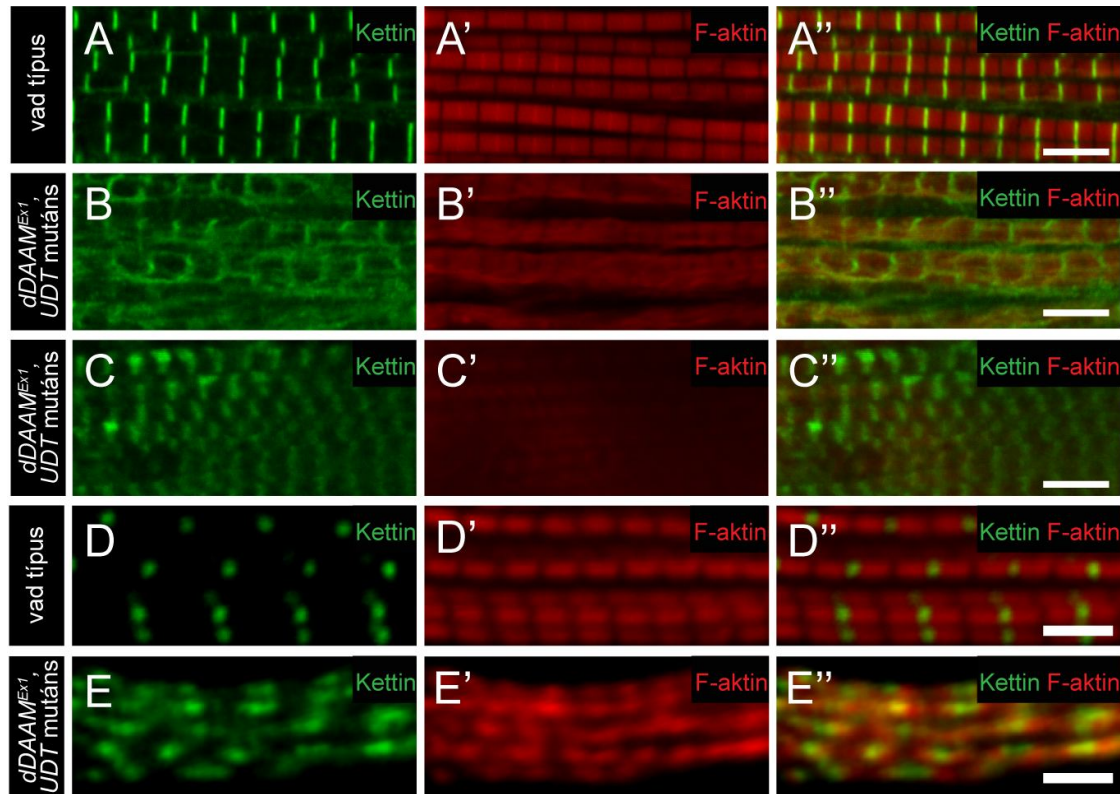
A $dDAAM^{Ex1}$, UDT IFM esetében a fenotípus súlyosbodását figyelhetjük meg, kezdve az izomrostok egy részének az elsorvadásával (23. ábra B). A megmaradó miofibrillumok pedig nem csak vékonyabbak a vad típusnál (az átmérő csökkenés eléri a ~31%-ot), hanem a szervezetségüket is elvesztették (24. ábra C-C''; 25. ábra B-C''). Immunfestés alapján az F-aktin szint is csökkentnek látszik, viszont a G-aktin mennyiségében nem találtunk változást a vad típushoz képest (24. ábra D). Rodamin-falloidin festés alapján kimutattuk, hogy a vékony (aktin) filamentumok hossza nem egyenletes. A szarkomer hosszának rövidülése ezekben a miofibrillumokban elérheti a 38%-ot. Az M-vonal nehezen mutatható ki miozin immunfestés segítségével (24. ábra C), míg a Z-korongok szabálytalan és delokalizált festődést mutattak (25. ábra B-C'').



24. ábra A $dDAAM$ mutánsok IFM fenotípus komponensei. (A-A'') A röpképtelen $dDAAM^{Ex1}$ -es mutánsok IFM miofibrillumai nagyjából normálisnak tűnnek, csak a szarkomerek egy részének rövidebb a hossza. (2,5 μ m a 3,2 μ m helyett; a kettint zölddel, az aktint pirossal jelöltük). (B-C'') Vad típusú (B-B'') és a $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutáns (C-C'') miofibrillumok immunhisztokémiai festése, amelyben a miozint (zöld) és az aktint (piros) jelöltük. A $dDAAM$ mutánsban megfigyelhető a károsodott miozin és M-vonal szerveződés, és a jelentős F-aktin szint csökkenés. (D) Coomassie festéssel nem találtunk különbséget a vad típusú és a $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutáns IFM-ek G-aktin tartalma között. A skála mérete: 5 μ m.

A bábállapot kialakulásától (After Puparium Formation, APF) számított 48 óras $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok IFM-jében (29° C-on) már megfigyelhetőek ugyanazok a fenotípusos elváltozások, amelyeket a fiatal felnőtt állatok esetében tapasztaltunk. (Az UAS/Gal4 rendszer

hatékonysága hőmérséklet függő, ezért minden RNS interferenciás kísérletet 29° C-on végeztünk). Látható volt a szabálytalan miofibrillum szerveződés, az M-vonalak hiánya, valamint a Z-korongok rendszertelen elhelyezkedése (25. ábra E-E’’).



25. ábra További *dDAAM* mutáns IFM fenokópiák. (A-A’’) A vad típusú IFM miofibrillumaiban egy rendkívül szabályos szarkomer szerkezet figyelhető meg. (B-C’’) Két különböző *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutáns egyedből származó miofibrillum fenokópia. Jól láthatóak az összetett szarkomer defektusok (B-C’’) beleértve a csökkent F-aktin szintet (piros színnel jelölve), a szabálytalan rostvastagságot, kettin ellenanyaggal festett rendezetlen Z-korongok jelenlétét (zölddel jelölve), és a szarkomer hossz csökkenést (C-C’’). (D-E’’) 48 órás bábok IFM miofibrillumai vad típusú (D-D’’) és *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutáns (E-E’’) állatok esetében. A mutáns IFM súlyos Z-korong és M-vonal szerveződési hibákat mutat. A skálák mérete: az A-C’’ paneleken 5µm, a D-E’’ paneleken 2 µm.

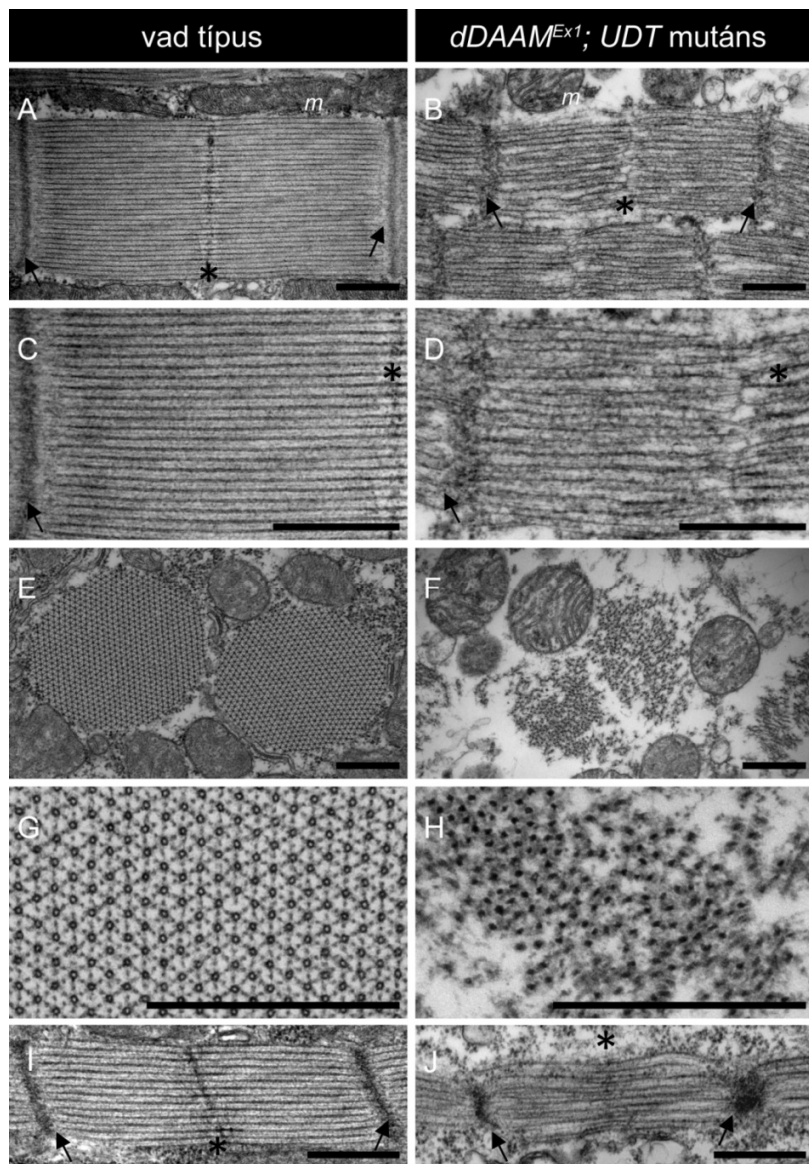
Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a *dDAAM* fehérje hiánya az izomrostok, a miofibrillumok és a szarkomerek szintjén is szerkezetbeli változásokat okoz az izom morfológiájában.

3.2.2. A *dDAAM* mutánsok elektronmikroszkópos (EM) analízise

A *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutánsok elektronmikroszkópiás analízisével igazoltuk és kiegészítettük a konfokális mikroszkópia által nyert eredményeket. A hosszanti izommetszetek

elemzésével (**26. ábra A-D**) olyan vékony, szabálytalan alakú miofibrillumokat tudtunk kimutatni, melyek szélső részei felbomlóban voltak. Emellett a fenotípusos jegyek közül itt is az erős Z-korong defektusok, az M-vonal teljes hiánya, és a megrövidült hosszúságú szarkomerek voltak a legjellemzőbbek. Fontos megfigyelés, és ezt a konfokális mikroszkópiával készült képeken nem láthattuk, hogy a vékony filamentum rendszeren kívül a vastag filamentum rendszer szerveződése is súlyosan érintett. A vastag filamentumok ritkán párhuzamos lefutásúak, és számuk kisebb a vad típushoz képest, ugyanakkor lazább szerveződésűek (**26. ábra B, D**). Feltűnő módon, a vad típusra jellemző váltakozó vastag és vékony filamentumok szabályos elrendeződése helyett (**26. ábra A, C**), a vastag filamentumok közötti teret több vékony filamentum tölti ki, bizonyos helyeken hálózatot alkotva (**26. ábra B, D**). Annak ellenére, hogy a mutáns filamentumok szerveződése nagyon különbözik a vad típusétól, méretük alapján rendezetlen vékony (aktin) filamentumoknak tűnnek. Egy másik lehetőség szerint, de ennek kisebb a valószínűsége, olyan összekötő filamentumokról lenne szó, amelyek Sallimus/Kettin fehérjét tartalmaznak és a Z-korongokat kötik össze a vastag filamentumokkal a rovar indirekt repülőizomban. Szabálytalan alakú miofibrillumok láthatóak a mutáns IFM-ek keresztmetszeti képén is. A vastag filamentum csoportokat szürke színű anyag veszi körül. Egyedi vékony filamentumok ritkán fordulnak elő (**26. ábra H**). A vad típusú miofibrillum kristályrácsra emlékeztető szerkezete még nyomokban sem fedezhető fel. Keresztmetszeti képeken a vad típus esetében a vastag filamentumok belseje üregesnek látszik, ez alól csak az M-vonal környéke jelent kivételt, ahol sötét színűek (**26. ábra G**) (Reedy és mtsai. 1993). Ezzel szemben a *dDAAM* mutánsban a vastag filamentumok keresztmetszete az esetek többségében nem tűnik üregesnek, hanem nagyon sötét színű, és emellett a vad típushoz képest szabálytalan alakú (**26. ábra H**). A 48 órás mutáns báb izmok EM analízisével is kimutatható volt a szarkomerhossz csökkenés (ami

elérte a 33%-os csökkenést a vad típushoz képest), az M-vonal hiány, a rosszul szerveződő filamentumok és a súlyos szerkezetbeli defektus a Z-korongok szintjén (26. ábra J).



26. ábra A *dDaam* mutáns IFM-ek elektronmikroszkópos analízise.

Vad típusú (A, C, E, G, I) és *dDAAM^{Ex1}*; *UDT* mutánsok IFM-jeiről készült elektronmikroszkópos felvételek (B, D, F, H, J). Az adult IFM-ek hosszanti metszeiről készült felvételeken látható, hogy a vad típusú (A, C) szigorúan rendezett szarkomer szerkezetéhez képest a *dDAAM* mutánsok miofibrillaiban (B, D) különböző defektusok figyelhetők meg a Z-korongok és M-vonalak szintjén, továbbá a megrövidült szarkomerekben a vékony és vastag filamentumrendszer sokkal lazábban szerveződött. A vad típusú izmok keresztmetszeti képein (E, G) az IFM-re jellemző módon egy vastag filamentumot hexagonálisan 6 vékony filamentum vesz körül. Ez a rendezettség a mutáns miofibrillumokban teljesen megszűnt (F, H). Ehelyett a mutáns rostok szabálytalan alakúak, a vastag filamentumok csoportosulásokat alkotnak, alig fedezhetőek fel egyedi vékony filamentumok. Megjegyzendő, hogy a vad típusú vastag filamentumok belseje üreges (G), míg a *dDAAM* mutánsoké nagyon sötét színű, szabálytalan alakú, és csak nagyon ritkán üreges belsejű (H). A báb IFM (48 órás APF) hosszanti metszeti képeken (I, J), látható, hogy a vad típushoz képest (I) a mutáns izmokban (J) súlyos Z-

korong és M-vonal defektusok, szarkomerhossz rövidülés és szabálytalan filamentum szerveződés van jelen. A képeken nyilakkal jelöltük a Z-korongokat, csillaggal az M-vonalakat, és „m”-el a mitokondriumokat. A skála mérete: 500 nm.

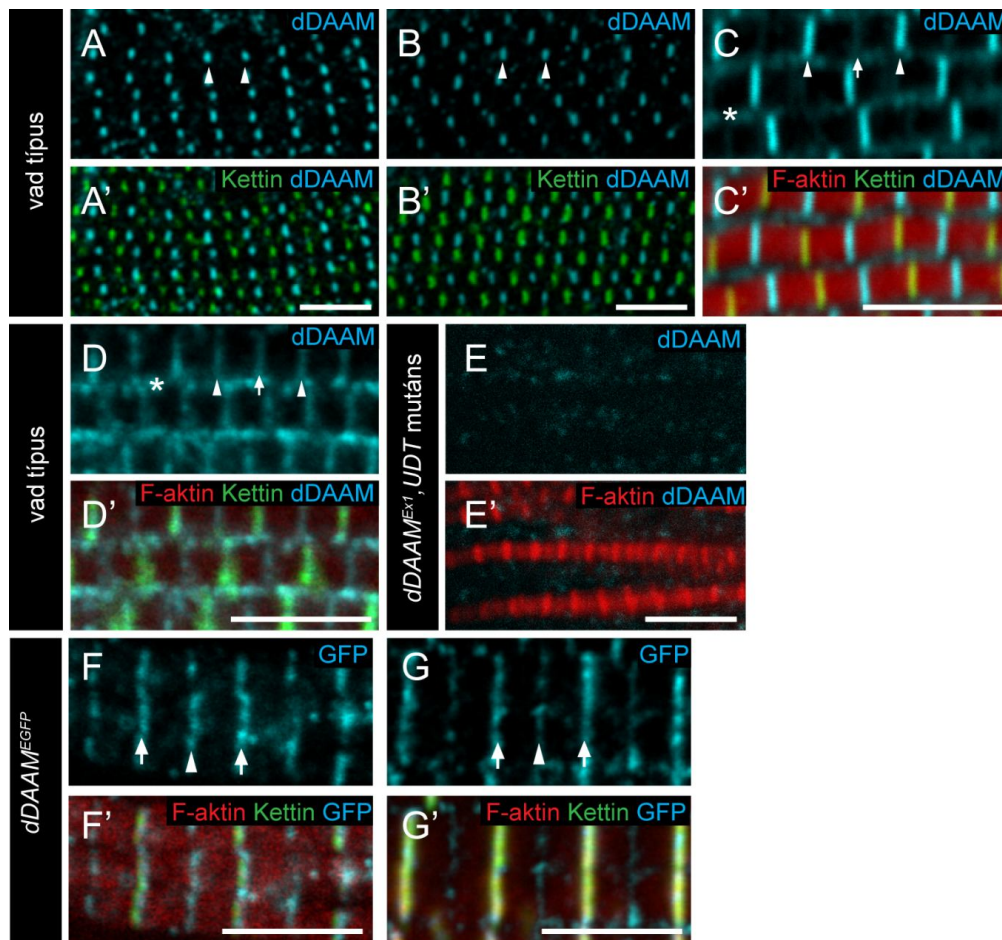
Ezek az adatok azt igazolják, hogy a *dDAAM* mutánsokban tapasztalt izomdefektusok már az izomfejlődés korai szakaszában megjelennek.

3.3. A dDAAM fehérje szarkomerikus lokalizációja

A dDAAM fehérjének a miofibrillumok kialakításában betöltött szerepét tovább jellemezve megvizsgáltuk annak IFM-beli lokalizációs mintázatát. Elsőként frissen kikelt adultok indirekt repülőizmában végeztünk immunhisztokémiai festéseket. A dDAAM-ra specifikus ellenanyag (Matusek és mtsai. 2006) egy erős sávot jelölt az IFM szarkomereinek M-vonalhoz közeli régiójában és egy gyengébb sávot a Z-korong környékén (**27. ábra C**). (Ezen kívül a dDAAM ellenanyag a szarkolemmát és a sejtmagokat is megjelöli.) Ez a mintázat a legkorábbi vizsgálható időponttól, a bábállapot kialakulása utáni 48 órától egészen a fiatal adult állapotig lényegileg azonos volt (**27. ábra A-C**). Ugyanakkor az idősödő állatokban az M-vonal környékén a festődés erőssége az idő függvényében fokozatosan csökkent, a Z-korongok környékén viszont erősödött. Ez a tendencia úgy folytatódott, hogy a kikelés után számított negyedik napon az M-vonal és Z-korong környéki sávok erőssége egyformává vált (**27. ábra D**). A $dDAAM^{Exl}$, UDT mutánsokban, amelyek közel dDAAM fehérje nullnak tekinthetők (**27. ábra E**), csak háttérfestődést tudtunk detektálni, ami az ellenanyag specifitását is bizonyítja.

Hogy az immunfestés eredményeit kiegészítsük, egy *in situ* C-terminálisan EGFP-vel jelölt $dDAAM^{EGFP}$ allélt hoztunk létre. A $dDAAM^{EGFP}$ allél életképes és fertilis homo- és hemizigóta állapotban is, és ennek a fehérjének az expressziója az endogén szabályozó régiók ellenőrzése alatt áll. A dDAAM::EGFP fúziós fehérje immunhisztokémiai festése α -GFP ellenanyaggal nagyjából hasonló erősségű sávokat mutatott mind az M-vonalak, mind a Z-korongok szintjén a fiatal állatokban, a négy napos állatokban pedig a festődés erőssége csökkent az M-vonalak területén (**27. ábra F, G**).

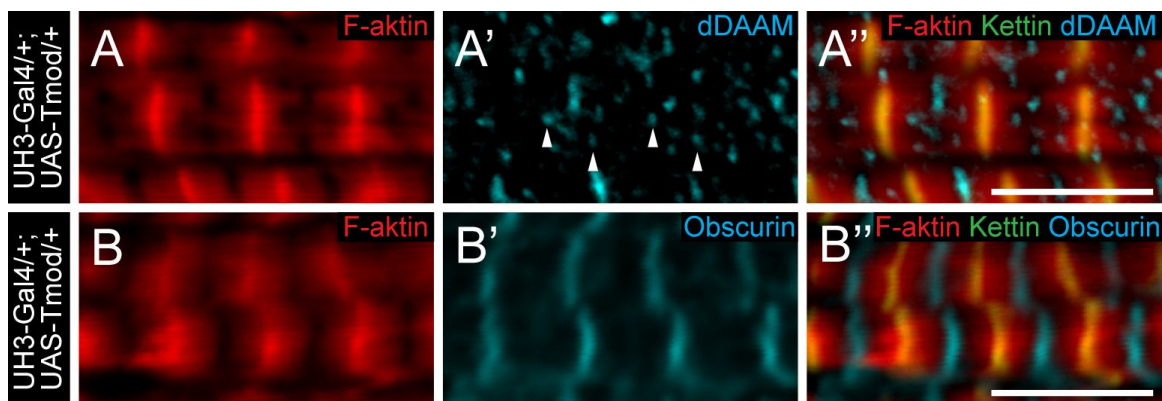
Annak ellenére, hogy az α -dDAAM ellenanyag az EGFP ellenanyaghoz képest különbséget mutat a korai és késői dDAAM festődési mintázat között, végső soron kétféle megközelítésben sikerült igazolnunk, hogy a dDAAM fehérje jelen van mindkét helyen: a Z-korongok és az M-vonalak környékén is.



27. ábra A dDAAM fehérje szarkomerikus lokalizációja az IFM-ben. Vad típusú 48 órás (A-A'), 72 órás báb (B-B'), frissen kikelt adultok (C-C') és a 4 napos adultok (D-D') IFM-jeinek dDAAM immunfestése (ciánkékkel jelölve). A dDAAM fehérje az M-vonal (nyílhegygel jelölve) és a Z-korongok közelében (nyíllal jelölve), illetve a szarkoplazmában (csillaggal jelölve) lokalizálódik. Megfigyelhető, hogy míg a Z-korong közeli felhalmozódás alacsony szintű a báb és fiatal adultok IFM-jeiben (A-C), addig a 4 napos adultokban a festődés egyforma erősségű az M-vonalak és az Z-korongok szintjén. Ezzel ellentétben, a $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok IFM-jeiben csak egy gyenge háttérfestődést detektáltunk (a D és az E panel összehasonlítva). A frissen kelt (F-F') és a 4 napos (G-G') $dDAAM^{EGFP}$ adultokban az anti-GFP egyértelmű festődést mutat a Z-korongok (nyíllal jelölve) és az M-vonal (nyílhegygel jelölve) közelében. A rodamin-falloidin festést pirossal, a Z-korong marker kettint zölddel, az anti-dDAAM-ot (A-E') és az anti-GFP-t (F-G') ciánkékkel jelöltük. A skála mérete: 5 μ m.

Mivel a vastag és vékony filamentumok a *Drosophila* IFM esetében szinte teljesen átfednek a szarkomer teljes hosszában, nem tudtuk minden kétséget kizáróan megállapítani, hogy

a szarkomer közepén megfigyelt dDAAM fehérje feldúsulás M-vonal asszociált, vagy a vékony filamentumok végéhez köthető, amelyek az M-vonalhoz közel érnek véget. Hogy választ tudjunk adni erre a kérdésre, egy olyan kísérleti megközelítést alkalmaztunk, amelyben a Tmod fehérje túltermelésével változó mértékben megrövidült vékony filamentumok képződését idéztük elő az IFM-ben. Az *UH3-Gal4/+; UAS-Tmod/+* mutáns legyekben a Tmod fehérjetöbblet meggátolja a vékony filamentumokat a növekedésben, aminek eredményeképpen ezek hossza és illeszkedése sem lesz egyenletes (a végek nem állnak szabályos regiszterben az M-vonal két oldalán) (28. ábra A, B), de az M-vonal szerveződése nem változik számottevően, amint ezt az F-aktin és Obscurin festődésből meg tudjuk ítélni (28. ábra B-B”).

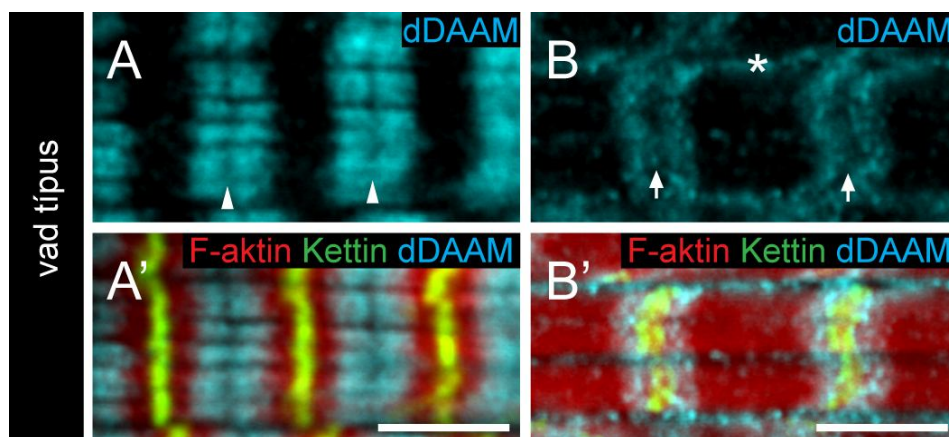


28. ábra A dDAAM fehérje szarkomerikus lokalizációja Tmod túltermelő mutánsok IFM-jeiben. A Tropomodulin fehérje túltermelése az *UH3-Gal4/+; UAS-Tmod/+* genotípusú legyekben a vékony filamentumok megrövidülését eredményezte, melyek hossza nem egyenletes, és az illeszkedésük sem megfelelő, ahogy erre az F-aktin festésből következtetni lehet (A, B). Ezekben az IFM-ekben a dDAAM festődés pontozott eloszlást mutat (nyílhegygel jelölve az “A” panelen), amelyek többsége a vékony filamentumok mínusz végeivel kolokalizálnak (A”). Ezekben a mutánsokban az M-vonal majdnem teljesen épnek tűnik, amennyire azt az Obscurin festés alapján meg tudtuk becsülni (B’). A rodamin-falloidin festést pirossal, az anti-dDAAM-ot (A’-A”) és az anti-Obscurin-t (B’-B”) ciánkékkel jelöltük. A skála mérete: 5 µm.

Ezekben a mutáns IFM-ekben a dDAAM fehérje eloszlása teljesen különbözik a vad típusútól és már nem alkot szabályos alakú sávot az M-vonal közelében. Ehelyett pontozott eloszlású festődést figyelhattunk meg, ahol a dDAAM fehérjét jelölő pontok a vékony filamentumok végeivel kolokalizáltak (28. ábra A”). Ez arra utal, hogy a vad típusra jellemző

szarkomer közepi dDAAM fehérje feldúsulás nagy valószínűséggel az aktin filamentumokhoz való asszociációt és nem az M-vonalhoz való kötődést jelzi.

Az előző konklúzióval összhangban, a fejlődő lárvális testfal izmokban (72 órával AEL után) a dDAAM fehérje két különálló sávba tömörül az M-vonal két oldalán (**29. ábra A**). Érdekes módon, a kifejlődött lárvális miofibrillumokban viszont a dDAAM fehérje legnagyobb mennyiségben már a Z-korong környékén mutatható ki (**29. ábra B**). Ennek a mintázatbeli változásnak a biológiai jelentősége egyelőre nem világos, de figyelemreméltó, hogy két másik izomfehérje, a SALS és a Tmod is hasonló kifejeződési mintát mutat (Bai és mtsai. 2007).



29. ábra A dDAAM fehérje szarkomerikus lokalizációja a lárvális testfal izmokban. A fejlődő lárvális testfal izmokban (72 h AEL), a dDAAM festődés két sávra különül el az M-vonal két oldalán (nyílhegygel jelölve az A-A' paneleken). A teljesen kifejllett lárvális testfal

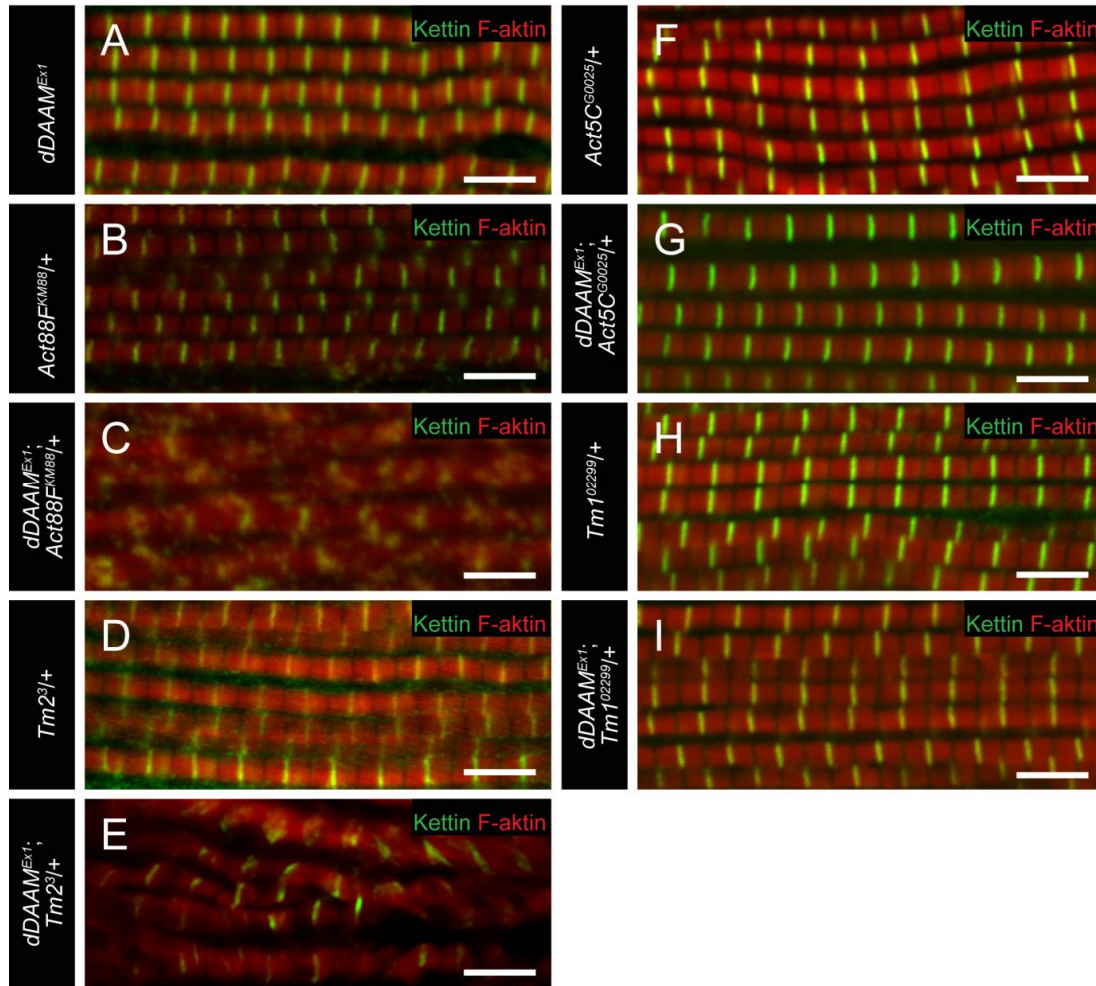
izmokban a dDAAM festődés áttevődik a Z-korongok környékére (nyílvevesszővel jelölve a B-B' paneleken). Csillaggal jelöltük a miofibrillumok közötti tér festődését. A skála mérete: 5µm.

A lokalizációs adatok azt jelezték, hogy a dDAAM fehérje a növekvő szarkomerekben olyan mintát mutat, amely teljes összhangban van a vékony filamentumok szabályozásában betöltött szerepével.

3.4. A dDAAM fehérje kölcsönhat a vékony filamentum mutánsokkal

Hogy további bizonyítékokkal szolgáljunk arra nézve, hogy a dDAAM-nak fontos szerepe van a vékony filamentum rendszer kialakításában és szabályozásában, genetikai interakciós kísérleteket végeztünk az IFM specifikus aktin (*Act88F^{KM88}*) és az izom specifikus Tropomiozin (*Tm2³*) mutánsokkal (Karlik és Fyrberg 1985; Okamoto és mtsai. 1986). Az IFM szerkezetét

heterozigótákban vizsgáltuk vad típusú és $dDAAM^{Ex1}$ mutáns háttérén. Az eredményekből kitűnik, hogy az egyébként gyenge hipomorf $dDAAM^{Ex1}$ -es IFM fenotípust (30. ábra A) nagymértékben súlyosbítják az $Act88F^{KM88}$ és $Tm2^3$ mutációk.



30. ábra A $dDAAM$ kölcsönhat a vékony filamentum mutánsokkal. (A) $dDAAM^{Ex1}$, (B) $Act88F^{KM88}/+$, (C) $dDAAM^{Ex1}; Act88F^{KM88}/+$, (D) $Tm2^3/+$ and (E) $dDAAM^{Ex1}; Tm2^3/+$ legyekből származó IFM miofibrillumok (az aktin pirossal, a kettin zölddel jelölt minden panelen). Megfigyelhető, hogy a szarkomer szervezetség a $dDAAM^{Ex1}$ (A) állatokban a vad típuséhoz hasonló; ugyanígy az $Act88F$ (B) és a $Tm2$ (D) heterozigótákban a miofibrillumok és a Z-korongok szabályos elrendeződésűek. Ezzel szemben a $dDAAM^{Ex1}; Act88F^{KM88}/+$ (C), $dDAAM^{Ex1}; Tm2^3/+$ (E) genotípusú legyek miofibrillumai rendkívül szervezetlenek. A kontrollként használt kísérletekben pedig az $Act5C^{G0025}/+$ (F), $dDAAM^{Ex1}; Act5C^{G0025}/+$ (G), $Tm1^{02299}/+$ (H), és a $dDAAM^{Ex1}; Tm1^{02299}/+$ (I), mutánsok miofibrillumai a vad típuséhoz hasonló szervezetséget mutattak. A skála mérete: 5 μ m.

Az $Act88F^{KM88}$ heterozigóták miofibrillumai vékonyabbak a vad típusénál, és néhány Z-korong nem egyenletes alakú (30. ábra B), de egyébként a szarkomer szerkezet rendezettsége fennmaradt. Ezzel szemben, a $dDAAM^{Ex1}; Act88F^{KM88}/+$ kettős mutánsban egy szerteágazó

vékony miofibrillum hálózat figyelhető meg, amelyben a Z-korongok és a szarkomerek rendezett szerkezete teljesen megszűnik (**30. ábra C**). Hasonló módon, a $dDAAM^{Ex1}$ hemizigóta; $Tm2^3$ / + kettős mutánsokban a miofibrillumok szervezetlenek, a vastagságuk nem egyenletes, a szarkomerek és a vékony filamentumok hossza sem egyenletes és gyakori a nagyon rövid szarkomerek megjelenése (**30. ábra E**). Kontrollként az egyik legfontosabb nem-izom sejt specifikus aktin izoformának, az *Act5C*-nek a null mutáns formáját használtuk, a G0025-ös allélt (Fyrberg és mtsai. 1983), és a citoplazmatikus Tropomiozin (*Tm1*) izoforma egy erős funkcióvesztéses allélját, a $Tm1^{02299}$ –et (Tetzlaff és mtsai. 1996). Az elvárt módon, ezek a mutációk nem súlyosbították a $dDAAM^{Ex1}$ IFM fenotípusát (**30. ábra G, I**).

Az erős genetikai kölcsönhatás a $dDAAM$ és az IFM specifikus $Act88F^{KM88}$ és $Tm2^3$ allélok között, valamint az interakció teljes hiánya a nem-izom típusú izoformákkal azt jelzi, hogy a $dDAAM$ fehérje funkciója az izomfejlődés során valóban a szarkomerikus aktin filamentumok kialakításához kötődik.

3.5. A $dDAAM$ fehérje szükséges a vékony filamentumok növekedéséhez

In vitro körülmények között a $dDAAM$ fehérje FH2 vagy FH1-FH2 doménjei *bona fide* formiként viselkednek, vagyis rendelkeznek aktin nukleáló és a filamentumok elongációját elősegítő képességgel (Barkó és mtsai. 2010). Az a megfigyelésünk, hogy a vékony filamentumok rövidebbek a $dDAAM$ mutánsokban mint a vad típusban, arra enged következtetni, hogy a $dDAAM$ pozitív regulátora a vékony filamentum növekedésnek. Az irodalmi adatokkal összhangban, miszerint a vékony filamentumok a mínusz vég felől növekednek, a $dDAAM$ jelen van a vékony filamentumok mínusz végeinek a közelében, vagyis az M-vonal környékén. Másrészt, egy formintól elvárt módon a plusz végek közelében is felhalmozódik. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy a $dDAAM$ fehérjének van-e szerepe a vékony filamentumok mínusz vég felőli

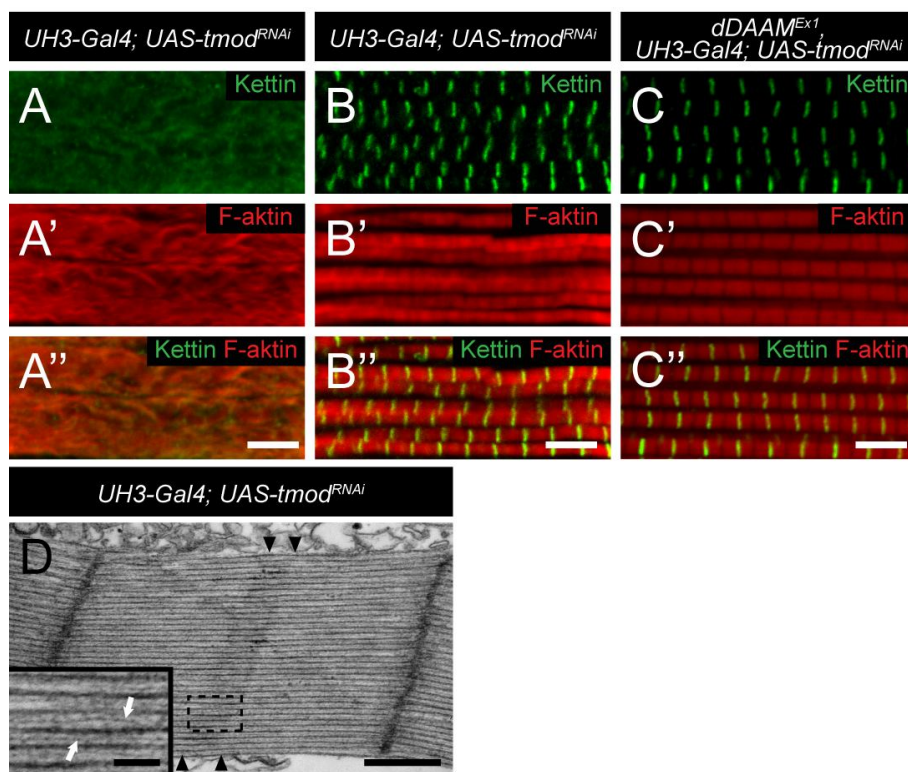
növekedésében, genetikai interakciós kísérleteket végeztünk két bizonyítottan mínusz vég szabályozó fehérje mutáns alléljaival, a SALS-szal és a Tmod-dal.

A SALS fehérje *in vivo* körülmények között elősegíti (Bai és mtsai. 2007), míg a Tmod kötődés megakadályozza a vékony filamentumok elongációját (Littlefield és Fowler 2008). A *sals*^{f07849} / + a *dDAAM*^{Ex1}-es mutáns háttéren nem okozott fenotípusbeli változást. Ezzel szemben a *tmod*^{f00848} mutáció teljes mértékben szupresszálta a *dDAAM*^{Ex1} mutáns gyenge röpképtelen fenotípusát, visszaállítva a vad típushoz közeli értéket (4,9 %, n=160; a vad típus esetében: 4,5%, n=454), **(14. ábra A)**. Ez arra utal, hogy a filamentum növekedés során a dDAAM és a Tmod működésüket tekintve antagonisztikus kapcsolatban lehetnek egymással.

Hogy részletesebben elemezni tudjuk a dDAAM/Tmod kölcsönhatást, először a Tmod IFM-specifikus RNS interferenciás csendesítését vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az izomrostok többségében a miofibrillogenezis súlyos zavart szenvedett **(31. ábra A-B’)**, de a miofibrillumok hozzávetőleg 10%-ában felismerhető volt a Z-korongok jelenléte. Itt elvégezhetjük a szarkomer hossz méréseket, és kimutattuk, hogy a *tmod* csendesítése a szarkomer hossz 18%-os csökkenését ($2.62 \pm 0.11 \mu\text{m}$; n=26) eredményezi a vad típushoz képest. Ezen kívül a szarkomerek középső régiójában - ahol normális esetben aktin nem fordul elő - vékony filamentumok jelenlétét mutattuk ki falloidin festés és EM analízis segítségével **(31. ábra B’, D)**. Továbbá, az EM analízis segítségével az M-vonal szerkezetében beállt károsodásokat is meg tudtunk figyelni.

A miofibrillogenezisre gyakorolt erős hatás összhangban van az előzetes irodalmi adatokkal, melyekben kimutatták, hogy az egér *Tmod1* és a *C. elegans Unc-94 (tmd-1)* Tropomodulin ortológok szükségesek a szarkomer összeszerelődéshez (Fritz-Six és mtsai. 2003; McKeown és mtsai. 2008; Stevenson és mtsai. 2007; Yamashiro és mtsai. 2008). Viszont a szarkomer hossz csökkenés meglepő eredménynek számít, mivel előzetes adatok alapján a *Tmod*

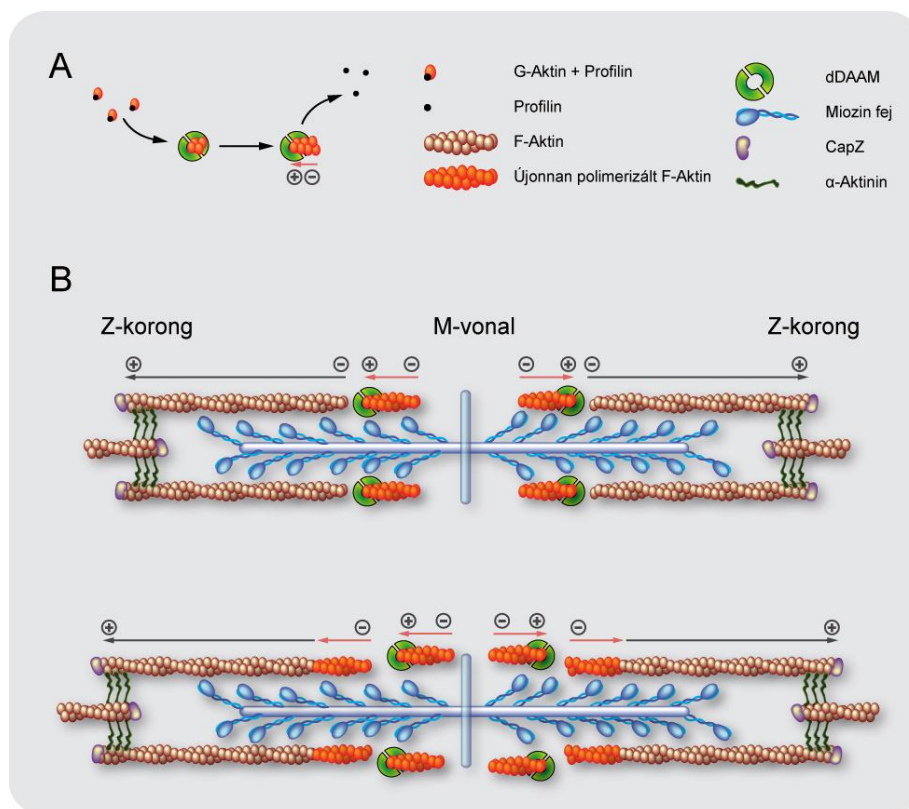
funkció gátlása meghosszabbodott szarkomereket eredményezett kardiomiocita sejttényezetekben (Sussman és mtsai. 1998), illetve *Drosophila* primer izomsejt kultúrákban (Bai és mtsai. 2007). Megjegyzendő azonban, hogy bár az *UH3-Gal4; UAS-tmod^{RNSi}* legyek indirekt repülőizmában a szarkomer hossz rövidebb volt a vad típusénál, a vékony filamentumoknak egy része jól látható módon áthaladt a H-zóna határain (31. ábra D). Ennélfogva, az egyedi vékony filamentumok mérete hosszabb is lehet a vad típusénál, ez pedig összhangban van a Tmod ismert vékony filamentum hossz szabályozó szerepével.



31. ábra A *dDAAM* és *tmod* közötti kölcsönhatás. A *tmod* csendesítése súlyos szarkomer szerveződési rendellenességeket okozott (A-A''), habár a miofibrillumok ~ 10%-ban az RNSi fenokópia gyengébb volt, itt felismerhetőek voltak a Z-korongok, viszont hiányzott a H-zóna (B-B''). A *dDAAM^{Ex1}; UH3-Gal4; UAS-tmod^{RNSi}* legyek izmaiban a miofibrillumok többségének vad típusú volt a szarkomer szerveződése, egymástól szabályos távolságra levő Z-korongokkal és M-vonalakkal, és majdnem normális szarkomer hosszal (C-C''). (D) A *tmod^{RNSi}* IFM elektronmikroszkópos felvétele. Fekete nyílhegyekkel jelöltük a szarkomer közepének azt a részét, ahol az M-vonal struktúrák nem nyilvánvalóak, de úgy tűnik, hogy a vékony filamentumok áthaladnak ezen a részen, a szaggatott vonalú négyyszögnek megfelelő nagyított felvételen. Fehér nyilakkal jelöltük azokat a vékony filamentumokat, amelyek nem érnek véget a H-zónában. A skála mérete: 5 μ m (A-C''); 500 nm (D) 100nm (D, nagyított felvétel).

Ahhoz hogy megvizsgáljuk, hogy a *tmod*^{RNSi} fenotípus érzékeny-e a dDAAM fehérjeszint változásaira, a *tmod* csendesítést *dDAAM*^{Ex1} mutáns háttéren végeztük el. A miofibrillumok többsége (~80%) a vad típusra jellemző harántcsíkoltságot mutatva jól kivehető M-vonalakkal és csak kis mértékben megváltozott alakú Z-korongokkal. A szarkomer hossz is a vad típushoz közelebb álló értéket mutatott ($2.8 \pm 0.13 \mu\text{m}$; n=30) (**31. ábra C-C''**). Ez a fenotípus arra enged következtetni, hogy az alacsonyabb dDAAM fehérjeszint szupresszálja mind az általános szarkomer szerveződési fenotípust, mind pedig a vékony filamentumok „túlnövekedési” fenotípusát, amelyet a *tmod*^{RNSi} muslicák indirekt repülőizmában láttunk. Mindez megerősíti, hogy a két fehérje ellentétes hatással van a vékony filamentumok elongációjára, a Tmod gátolja azt, míg a dDAAM elősegíti a növekedést.

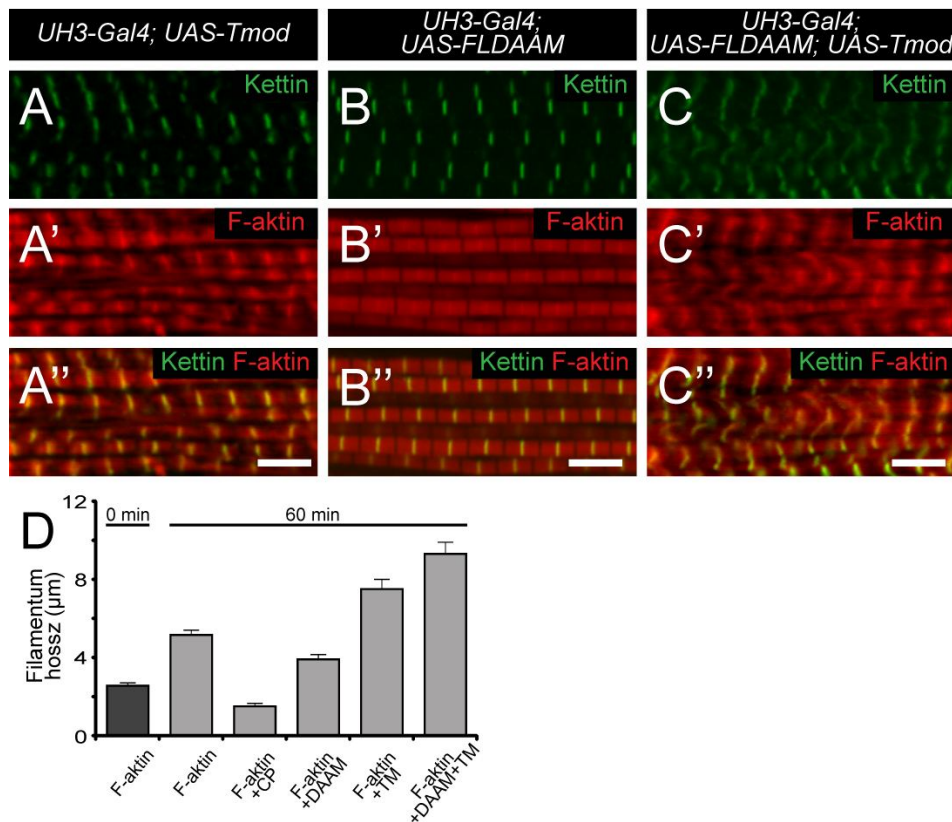
Habár a dDAAM fehérje a szarkomerikus vékony filamentumok mínusz vége közelében is lokalizálódik, korábbi szerkezeti vizsgálatok azt jelzik, hogy a forminok kizárólag plusz vég kötő fehérjék (Xu és mtsai. 2004; Lu és mtsai. 2007; Shimada és mtsai. 2004). Ennek az ellentmondásnak az egyik magyarázata az lehet, ha a mínusz vég felőli elongáció rövid aktin fragmentumok képződésén alapul, amelyek fokozatosan, oligomerként épülnek be a plusz végükkel a Z-koronghoz rögzített növekvő filamentumokba. Ebben a feltételezett modellben (**32. ábra**) a dDAAM rövid aktin fragmentumokat hozna létre, klasszikus plusz vég kötő fehérjeként működve, de emellett vagy aktív módon is elősegítené a fragmentumok beépülését, vagy legalábbis nem gátolná azt.



32. ábra A dDAAM által mediált mínusz vég felőli elongáció modellje. (A) A rövid aktin filamentumok nukleálása és elongálása a plusz vég kötő DAAM formin típusú fehérje által. (B) A vékony filamentumok mínusz vég felőli elongációjának egy lehetséges mechanizmusa a DAAM által összeszerelt rövid aktin filamentumok (narancssárgával jelölt) vég-vég kapcsolódása a Z-koronghoz kapcsolt hosszú, meglévő filamentumokhoz (barnával jelölt).

Hogy ezt a feltételezést igazolni tudjuk, egy *in vitro* F-aktin végillesztő aktivitási vizsgálatot végeztünk, melyben a dDAAM plusz vég kötő FH1-FH2 doménjeit használtuk. Azt találtuk, hogy az FH1-FH2 domén 100 nM-os koncentrációban nem gátolta az aktin filamentumok végeinek az összeolvadását (**33. ábra D**), habár korábbi *in vitro* vizsgálatokban, hasonló körülmények között a dDAAM FH1-FH2 doménjei szignifikánsan csökkentették a filamentumok plusz végeinek az összeszerelődését a pirén-jelölt aktin polimerizációs tesztben (Barko és mtsai. 2010). A korábbi vizsgálatokkal összhangban (Andrianantoandro és mtsai. 2001; Skau és mtsai. 2009), a plusz vég kötő CapZ fehérjének gátló hatása volt, a TM viszont elősegítette az aktin filamentumok vég-a-véghez illesztését, a TM és dDAAM együttes hatása pedig kissé még erősebb is volt, mint a TM-é egyedül (**33. ábra D**). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a dDAAM nem gátolta, sőt kismértékben segítette a TM végillesztő aktivitását, ami meglepő adat egy plusz vég kötő fehérjétől. Fenti modellünk alapján a mínusz véghez közeli

dDAAM lokalizáció bizonyos értelemben félrevezető, valójában a dDAAM a mínusz vég közelében is plusz vég kötő fehérjeként viselkedik. Ebből következik, hogy a valódi mínusz vég kötő Tmod és a dDAAM között valószínűleg nem lehet direkt kölcsönhatás vagy kompetíció. Ezt a feltevésünket úgy próbáltuk ellenőrizni, hogy megnéztük milyen hatással van a dDAAM és Tmod fehérjék együttes túltermelése a szarkomer morfológiájára. Az IFM specifikus Tmod túltermelés a vékony filamentumok megrövidüléséhez vezetett (Mardahl-Dumesnil és mtsai. 2001) (33. ábra A'), míg a dDAAM fehérjeszint növelése nem okozott számottevő változást az IFM szintjén (33. ábra B-B').



Aktin filamentum vég-vég kapcsolódás vizsgálata sötét szürkével a 0 perces kontrollt jelöltük, amely az átlagos filamentum hosszát ábrázolja 1µM F-aktin (F-aktin) jelenlétében, világos szürkével a 60 perces inkubáció utáni átlagos filamentum hosszakat ábrázoltuk az alábbiak szerint: 1 µM F-aktin (F-aktin), 1 µM F-aktin+ 10 nM capping fehérje (F-aktin+CP), 1 µM F-aktin + 100 nM DAAM-FH1-FH2 (F-aktin+DAAM), 1 µM F-aktin+ 1 µM vázizom Tropomiozin (F-aktin+TM), valamint 1 µM F-aktin+100 nM DAAM-FH1-FH2 + 1 µM vázizom Tropomiozin (F-aktin+DAAM+TM) jelenlétében. Az oszlopok az átlagértéket ábrázolják, melyek fölött a szórások értéke található. A skála mérete: 5 µm.

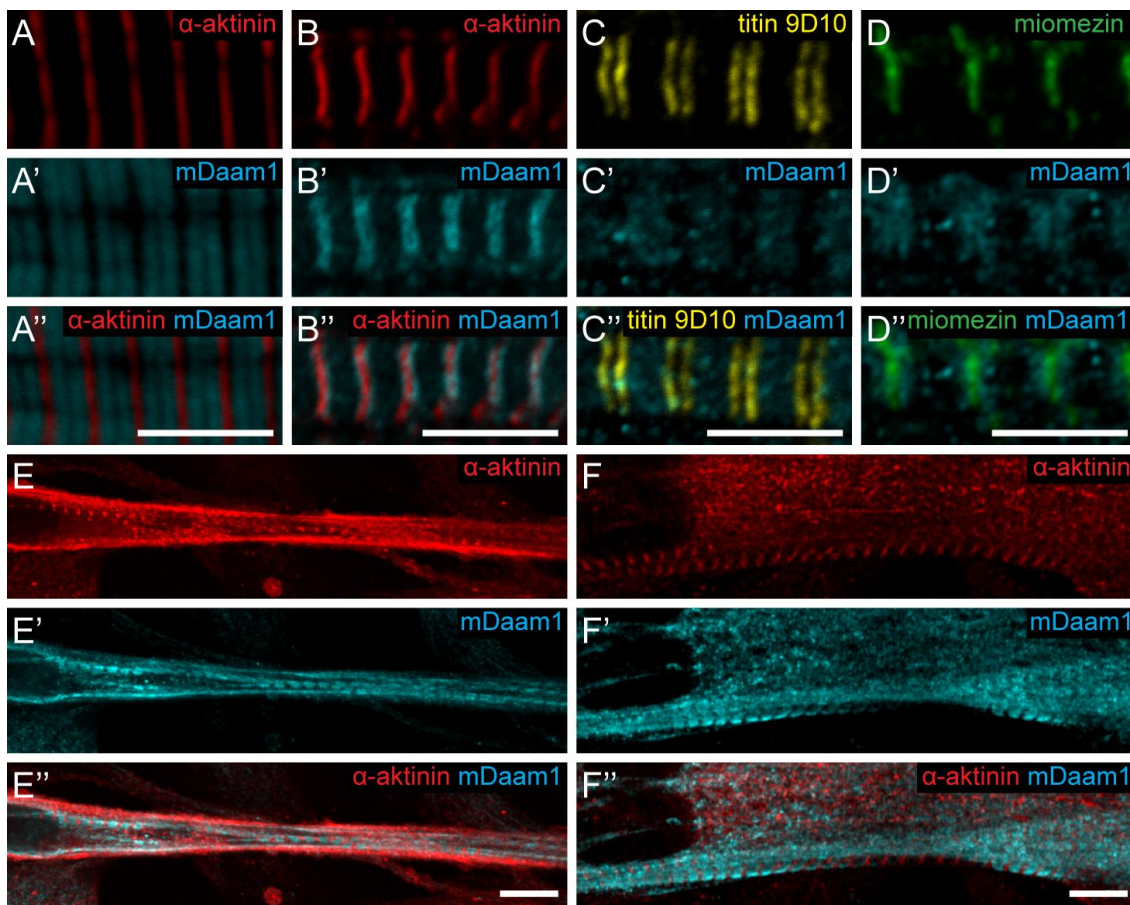
A két fehérje együttes túltermelése esetén a fenotipikus hatás megegyezett a Tmod önmagában való túltermelésének hatásával (**33. ábra C-C''**). Ez az eredmény jó összhangban van a feltételezésünkkel, hiszen jelzi, hogy a mínusz vég kötő Tmod fehérjével a dDAAM nem képes direkt módon versengeni, ami logikus, ha modellünknek megfelelően a dDAAM valójában a plusz végekhez kötődik.

A fenti kísérleti adatok megerősítik elképzeléseinket a feltételezett végillesztési mechanizmusról, amelyben a dDAAM fehérje által létrehozott oligomer aktin filamentumok összekapcsolódnak a növekvő filamentumok végeivel.

3.6. Evolúciós konzerváltság

Mivel sok izom fehérje esetében magas evolúciós konzerváltságot mutattak ki, és az egér *Daam1* (*mDaam1*) génről kimutatták, hogy részt vesz a szívfejlődésben (Li és mtsai. 2011), ezért úgy döntöttünk, hogy immunfestéses kísérletben megvizsgáljuk az *mDaam1* fehérje lokalizációját 15 napos egerekből származó harántcsíktolt izommetszeten. A vizsgált izmok közül az *m. tibialis anterior* metszeten az *mDaam1* fehérje két sávban, az M-vonal két oldalán lokalizálódott, míg az *m. vastus lateralis* metszeten a legtöbb fehérjét a Z-korongok környékén mutattuk ki (**34. ábra A-B''**). A következőkben kíváncsiak voltunk arra is, hogyan alakul az *mDaam1* lokalizációs mintázata a miofibrillogenezis korai időszakában. Ehhez egy C2C12 nevű egér miogén sejtvonalat (Yaffe és Saxel 1977) és markerként α -aktinint használtunk. Az α -aktinin a miofibrillogenezis egyik korai markerének számít (Kontogianni-Konstantopoulos és mtsai. 2006). Azokban a C2C12 sejtekben, amelyeket 24 órával az izom irányba történő differenciálódásuk után vizsgáltunk, az *mDaam1* fehérjét a szarkomerek szintjén két széles sávban detektáltuk a Z-korong kezdemények (Z-testek) és az M-vonalak között (**34. ábra E-E''**). A 48 és 96 órás differenciálódott C2C12 sejtekben a 24 óráshoz hasonló festődési mintázatot

láttunk (34. ábra F-F''). A két, mDaam1 által jelölt szarkomerikus sáv helyének pontosabb meghatározására kettős festés használtunk, az α -Titin (9D10) és az α -myomesin (B4) ellenanyagok segítségével 96 órás differenciálódott sejteken. A 9D10 ellenanyag a PEVK régiót jelöli a Titin óriásmolekulán, amely az I-sávban lokalizálódik, közel az I- és A-sáv közötti határhoz (Trombitas és mtsai. 1998; Wang és mtsai. 1988), míg a B4 ellenanyag az M-vonalat jelöli (Grove és mtsai. 1984).



34. ábra Az mDaam1 fehérje szarkomerikus lokalizációja. (A-B'') Egér izom metszetek mDaam1 (ciánkékkel jelölve) immunfestése (a Z-korong marker α -aktinin pirossal jelölt). A *m.tibialis anterior* szarkomereiben az mDaam1 fehérje az M-vonal két oldalán (A-A''), míg a *m vastus lateralis*-ban többnyire a Z-korongok környékén lokalizálódik (B-B''). A 96 óráig differenciáltatott C2C12 sejtekben az mDaam1 immunfestés (ciánkékkel jelölve) a szarkomer közepén két széles sávot ad, melyek nem fednek át a Titin festődéssel (sárgával jelölt; 9D10 ellenanyag) (C-C'') sem az M-markernek tekintett miomezin sávokkal (zölddel jelölve) (D-D''). (E-F'') Az mDaam1 (ciánkékkel jelölt) és az α -aktinin (pirossal jelölt), festődési mintázata a 24 (E-E'') és 96 óráig (F-F'') differenciáltatott C2C12 sejtekben. A skála mérete: 5 μ m (A-D''); 15 μ m (E-F'').

Azt találtuk, hogy az mDaam1 festődés szignifikáns mértékben nem fed át egyik sávval sem, amit az előbb említett ellenanyagok jelölnek (**34. ábra C-D''**), jelezve, hogy az mDaam1 fehérje nagy része az M-vonal és az I-A határvonala között halmozódik fel, abban a régióban ahol a vékony és vastag filamentumok átfednek egymással.

Ezek alapján az mDaam1 fehérje szarkomerikus lokalizációjával kapcsolatban két fontos következtetést vonhatunk le. Egyrészt, az izom specifikus különbségeket leszámítva, az mDaam1 szubsarkomerikus lokalizációja alapvetően megegyezik a *Drosophila* DAAM fehérjéével a Z-korong és M-vonal környéki lokalizáció vonatkozásában. Másodsorban, az mDaam1 a szarkomer kezdeményekben ugyanolyan korán jelenik meg, mint az aktin keresztkötő α -aktinin, ami összhangban van azzal az elképzelésünkkel, hogy ennek a forminnak korai szerepe van a miofibrillogenezis során.

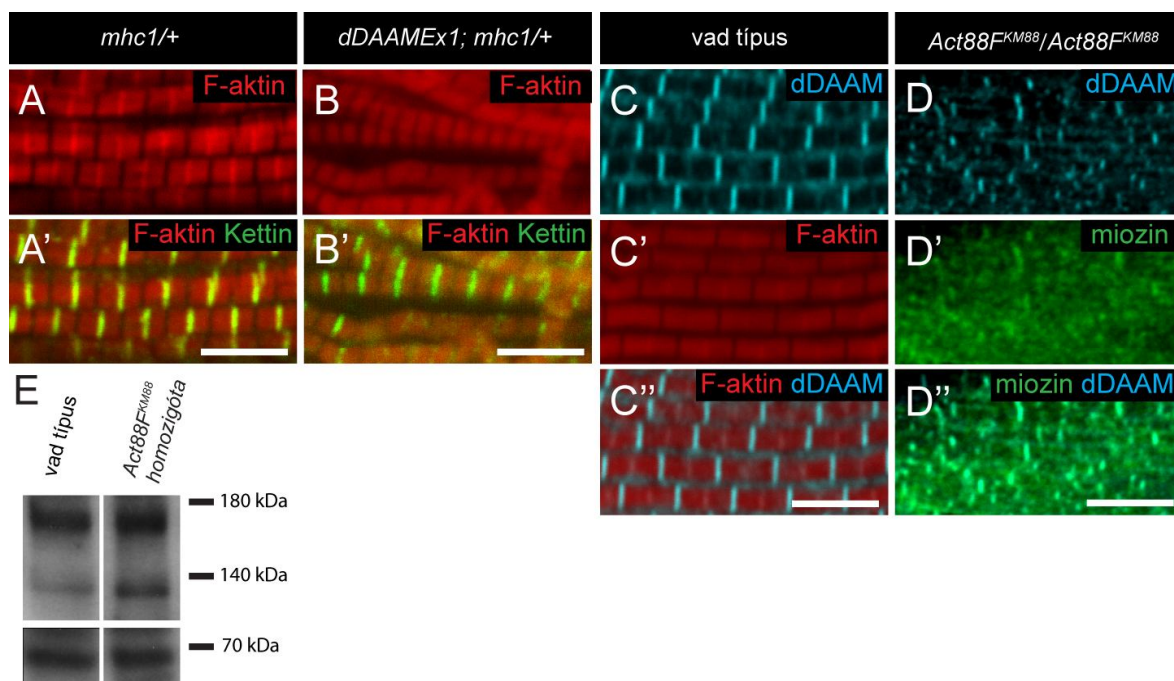
3.7. A dDAAM és a miozin közötti kölcsönhatás

Azon kívül, hogy a dDAAM fehérjének meghatározó hatása van a vékony filamentumok növekedésre, az EM analízis egy további, részben meglepő eredménnyel is szolgált, miszerint a dDAAM hiány a vastag filamentumok alakját és szerveződését is befolyásolja. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a dDAAM-ra az aktin szabályozó szerepén kívül szükség lehet a vastag filamentumok szerkezetének a kialakításában és/vagy az aktin és miozin filamentum rendszerek összehangolt felépítésében a rendezett szarkomer struktúrán belül. Hogy a dDAAM és a miozin közötti lehetséges kölcsönhatást ki tudjuk mutatni, ismét a *dDAAM^{Ex1}*-es hipomorf mutáns hátteret használtuk genetikai interakciós vizsgálatokhoz. Izomspecifikus miozin nehéz lánc *mhc* mutánssal, és a *zipper* (*zip*) nem-izom miozin izoformát kódoló alléllal is megvizsgáltuk a kölcsönhatást. Azt találtuk, hogy az *mhc¹* vagy *zip²* heterozigóta formában nem befolyásolta szignifikánsan az életképességet, viszont a *dDAAM^{Ex1}*; *mhc¹/+* és a *dDAAM^{Ex1}*;

zip^{2/+} mutáns hímek életképessége erősen lecsökkent (2.7% illetve 8.1%-os a túlélő hímek aránya az ugyanabból a keresztezésből származó nőstény állatok számához viszonyítva). A *dDAAM*^{Ex1}; *zip*^{2/+} felnőtt túlélő állatok röpképessége nem változott, és ennek megfelelően az indirekt repülőizomuk szerkezete is a vad típuséhoz volt hasonló. Ezzel ellentétben a *dDAAM*^{Ex1}; *mhc*^{1/+} állatok röpképtelenek, ahogy az *mhc*^{1/+} heterozigóta mutánsok is azok. Az *mhc*^{1/+} heterozigóták indirekt repülőizmában szerkezeti hibákat mutattunk ki, mint például a miofibrillum átmérőjének és a szarkomer hosszának a csökkenését (a szarkomer hossz csökkenés elérte a ~22%-ot), részben rendezetlen struktúrájú Z-korongokat, és szétváló izomrostok jelenlétét (**35.ábra A-A'**) (Beall és mtsai. 1989; O'Donnell és Bernstein, 1988). A fent említett fenotípusos elváltozások súlyosbodtak amennyiben az *mhc*¹ allél *dDAAM*^{Ex1}-es háttérre került. Különösen a Z-korong szerveződés volt rosszabb, mint az *mhc*^{1/+} heterozigótában, a szarkomer hossz csökkenés pedig gyakran elérte a 37%-ot, és a miofibrillumok általános szerveződése is sokkal lazább volt mint az *mhc*^{1/+} heterozigótáknál általában (**35.ábra B-B'**).

Érdekes módon, az *Act88F*^{km88} mutáció, a *dDAAM*-mal ellentétben, dominánsan szupresszálja az *mhc*^{1/+} izom fenotípust (Beall és mtsai. 1989). Ha a *dDAAM* összes izommal kapcsolatos funkciója kizárólag csak az aktin szabályozáshoz kötődne, nem lenne várható egy ilyen, az aktin mutánssal ellentétes hatás az *mhc* interakció vonatkozásában. Ezért az életképességet és az izomszerkezetet érintő, az *mhc* és a *dDAAM* közötti domináns genetikai kölcsönhatás arra utal, hogy a dDAAM az MHC fehérjével összehangoltan működik az izomfejlődés során, és úgy tűnik, hogy ez a kölcsönhatás a *dDAAM* aktin szabályozó funkciójától független. Ráadásul, említésre méltó, hogy a *dDAAM*^{Ex1}; *zip*^{2/+} kettős mutánsok csökkent életképessége is a legjobban azzal magyarázható, hogy a miozin/dDAAM kölcsönhatás a nem-izom sejtekben is fontos szerepet játszik. A dDAAM/MHC kölcsönhatást tovább elemezve

megvizsgáltuk a dDAAM fehérje lokalizációját az *Act88F* mutánsok IFM-jében. Az *Act88F^{km88}* homozigóta mutánsok IFM-jéből teljesen hiányoznak a vékony filamentumok (Beall mtsai. 1989), ennek ellenére nem találtunk csökkenést a dDAAM fehérje szintben az *Act88F^{km88}/Act88F^{km88}* mutáns indirekt repülőizmokban (35. ábra E).



35. ábra A dDAAM és a miozin közötti kölcsönhatás. (A-A') Az *mhc^{1/+}* legyek IFM-jeiben a szarkomer hossz csökkenés elérte a ~22%-ot, és a Z-korongok struktúrája is részben érintett. Ezek a fenotípusos elváltozások súlyosbodtak a *dDAAM^{Ex1}; mhc^{1/+}* legyekben (B-B'). A szarkomer hossz csökkenés itt elérte a 37%-ot. A Z-korong szerveződés gyengébb, a miofibrillumok általános szerveződése pedig sokkal lazább volt. A vad típusú IFM-ben a dDAAM a már említett módon, a Z-korongok, az M-vonalak környékén és a szarkoplazmában egyaránt lokalizálódik (C-C''). Az *Act88F* null homozigóta mutánsok IFM-jében, melyekből teljesen hiányoznak a szarkomerikus vékony filamentumok, a dDAAM fehérje viszont az izomrostokkal asszociált formában marad, és egy részleges kolokalizációt mutat a miozinnal (D-D''). (E) A Western blot analízis segítségével nem találtunk különbséget a vad típusú és az *Act88F* null homozigóta mutáns IFM-ek dDAAM fehérje szintje között. A skála mérete: 5 μ m.

Ezen túlmenően, a dDAAM fehérje asszociált maradt a kialakuló izomrostokkal, amelyek az *Act88F* hiányában képződtek, és ahelyett hogy a festődése egyenletes vagy teljesen véletlenszerű lenne, a fehérje pontozott illetve sávzott eloszlást mutatott az izomrostokban. Ez jelezte, hogy ezeknek a rostoknak a szerveződése nem szűnt meg teljesen, és ezek mentén még mindig léteznek dDAAM kötőhelyek (35. ábra D).

Tekintve, hogy az *Act88F^{km88}* mutánsok izomrostjai olyan vastag filamentumokból állnak, amelyek legalább részben megtartották az egyenletes illeszkedésüket (Beall és mtsai. 1989), ezek az eredmények azt mutatják, hogy a dDAAM fehérje képes kötődni a vastag filamentumokhoz, ez pedig további közvetett bizonyítékként szolgál a dDAAM és a miozin között fennálló kölcsönhatás igazolására.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A szarkomerikus aktin filamentumok az izmok alapvető szerkezeti és működési egységeit képezik, de a filamentumok kialakulása és a szabályozási mechanizmus, amely a miofibrillogenezis során zajlik, még nem ismert. A vékony (aktin) filamentumok kialakulásának kezdeti lépéseire nukleációs faktorok szükségesek, ezek közül eddig a Leiomodin és a Fhod3 fehérjéket írták le, mint izom specifikus nukleációs faktorokat, és hozták kapcsolatba a szarkomerikus aktin filamentumok elongációjával (Chereau és mtsai 2008; Taniguchi és mtsai 2009). A későbbi funkcionális analízisek során viszont kimutatták, hogy ezeknek a fehérjéknek nem a kezdeti aktin nukleációs lépésekben, hanem inkább a későbbi, a miofibrillumok fenntartását célzó aktin polimerizációban van szerepük. A *C. elegans*-ban végzett újabb kutatási eredmények arról számolnak be, hogy a formin fehérje család másik két tagja, a Cyk-1 (Diaphanous ortológ) és a Fhod-1, a Z-korongok környékén lokalizálódnak, és a rendezett filamentum struktúra növekedésében és fenntartásában játszanak szerepet (Mi-Mi és mtsai. 2012). Meglepő módon, a *cyk-1* és a *fhod-1* mutánsok fenotípusa viszonylag gyenge, és még nem tisztázott, hogy egyéb nukleációs faktorokra szükség van-e a fonálféreg izmok fejlődéséhez.

Munkánk során *in vivo* bizonyítékkal szolgáltunk arra nézve, hogy a DAAM - úgyszintén a formin fehérje család tagja - fontos szerepet játszik a szarkomerikus aktin filamentumok kialakulásában. Sikerült bizonyítanunk, hogy a DAAM fehérje szükséges a vékony filamentumok elongációjához, és hogy a DAAM aktin összeszerelő aktivitása nélkülözhetetlen a működőképes izmok kifejlődéséhez. Emellett azt is sikerült kimutatni, hogy a differenciálódó C2C12-es sejtekben az egér Daam1 ortológ ugyanolyan korán megjelenik a szarkomer kezdeményekben, mint a korai markernek tartott α -aktinin. Ezért a DAAM formin fehérje alcsalád tagjai nagy valószínűséggel részt vesznek a miofibrilláris aktin filamentumok korai

összeszerelődésében is. Érdekes módon, annak ellenére, hogy a *Drosophila DAAM* mutánsok izmai csökkent F-aktin tartalommal rendelkeznek, bizonyos mennyiségű vékony filamentum jelen van ezekben a mutáns izmokban. Hozzá kell tennünk viszont, hogy az izomszerkezet vizsgálatához rendelkezésünkre álló mutánsok közül egyik sem fehérje null allél. Ez megakadályoz bennünket abban, hogy kiderítsük, hogy vajon egy másik aktin nukleációs faktor, mint például a Dia vagy a Fhos, szükséges ahhoz, hogy ez az alacsony mennyiségű F-aktin szint jelen legyen, vagy a dDAAM fehérje csökkent szintje önmagában is elégséges a képződéshez.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a *dDAAM* a szarkomer fejlődés szempontjából fontos aktin összeszerelő faktor. Fontos adat, hogy a gerinces DAAM ortológok nagy mennyiségben találhatók a fejlődő szomitákban és a szívben (Li és mtsai. 2011; Nakaya és mtsai. 2004), és az *mDaam1* genetikai analízise során kimutatták, hogy a fehérje szerepet játszik a kardiomiociták szarkomer szerveződésében (Li és mtsai. 2011). A mi eredményeinkkel együtt ez azt jelentené, hogy a szarkomerikus aktin filamentumok kialakítása egy evolúciósan konzervált DAAM funkció.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a többi vékony filamentum összeszerelő fehérjékre jellemző módon, az IFM-ben a dDAAM fehérje a vékony filamentumok mindkét oldalán lokalizálódik. Korábban már kimutattuk, hogy *in vitro* körülmények között a dDAAM *bona fide* formiként viselkedik, vagyis rendelkezik mindazon tulajdonságokkal, amelyeket más forminokról leírtak (Barkó és mtsai. 2010). Elképzeléseink szerint a Z-korong környéki dDAAM a G-aktin beépülést szabályozza az aktin filamentumokba a plusz vég felől. A forminokra jellemző, hogy képesek elősegíteni új aktinláncok kialakulását, a gyorsan növekvő véghez való kötődésük egyben védő és szabályozó funkciót is jelent (processive capping). Mivel az IFM-ben a szarkomerikus dDAAM expresszió, a Z-korong környéki feldúsulást is beleértve, felnőttkorban

is fennmarad, valószínűnek tartjuk, hogy a dDAAM fehérje hozzájárul a normális miofibrilláris struktúra és működés fenntartásához.

A Z-korong környéki lokalizáción kívül a dDAAM a vékony filamentumok mínusz végeinek közelében is felhalmozódik. Tekintve, hogy a dDAAM elősegíti a vékony filamentumok növekedését és ellentétesen működik az F-aktin mínusz végének sapkázó fehérjéjével, a Tropomodulinnal, erre a legegyszerűbb magyarázat az lenne, hogy a dDAAM részt vesz a filamentumok mínusz vég felőli elongációjában. Ez összhangban lenne azzal a bizonyítékkal, hogy a szív miocitákban és a *Drosophila* primer sejt kultúrákban az aktin dinamika a filamentumok mínusz végein van túlsúlyban (Littlefield és mtsai. 2001; Bai és mtsai. 2007). Viszont a mínusz véghez közeli lokalizáció váratlan egy plusz vég kötő formin típusú fehérjétől. A rendelkezésünkre álló strukturális analízisek kizárják annak a lehetőségét, hogy egy formin típusú fehérje közvetlen módon kötődhessen a mínusz véghez. Elméletileg elképzelhető, hogy a dDAAM mínusz vég lokalizációja egy - a dDAAM-mal kölcsönhatásban levő - ismeretlen fehérjének tudható be. Egy másik lehetséges magyarázat lehet az, hogy a vékony filamentumok mínusz végei közelében is előfordulnak F-aktin plusz végek, amelyekhez a dDAAM kötődik. Habár teljességgel nem tudjuk kizárni az első lehetőséget sem, jelenleg annak a fajta fehérje-fehérje kölcsönhatásnak a mibenléte és a funkcionális jelentősége nem tisztázott. Ezért valószínűbbnek tartjuk a második elképzelést, amely az aktin összeszerelődéssel kapcsolatos érdekes kérdéseket is felvet. Ha plusz végek valóban léteznek a mínusz végek közelében, akkor a mínusz vég felőli elongáció azáltal tud megvalósulni, hogy a rövid aktin filamentumok vég-vég kapcsolódással hozzáadódnak a már meglévő hosszabb, és Z-korongokhoz rögzített filamentumokhoz (**32. ábra**). Egy ilyen növekedési mechanizmus, ha *in vivo* körülmények között bizonyítható lenne, magyarázatot adna a fent említett mínusz vég felőli gyors elongációra.

A kísérleti eredményeink összeegyeztethetők ezzel a modellel, amelyben a dDAAM mint plusz vég kötő fehérje elősegíti a kis fragmentumok kialakulását, és egyben lehetővé teszi az aktin vég-vég kapcsolódást is. Fontos kérdés, hogy mekkora lehet ezeknek a kis aktin fragmentumoknak a mérete. Ezzel kapcsolatban érdekes megfigyelés, hogy hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) a kontraktilis gyűrű kialakulása során a Cdc12p nevű formin típusú fehérje rövid aktin filamentumokat nukleált, amelyek aztán Tropomiozin (TM) jelenlétében kapcsolódtak egymáshoz. Ezzel összhangban, a mi *in vitro* kísérleteinkben a TM kétszeresére növelte az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódását. A TM fontos összetevője a vékony filamentumoknak, és kísérleti adataink vannak arra nézve, hogy az IFM specifikus *Tm2* mutáció dominánsan erősítette a *dDAAM^{Exl}* vékony filamentum fenotípusát. Ezért a kis filamentumok mérete véleményünk szerint nem lenne nagyobb 37-38 nm-nél, ami egy Tropomiozin molekula hosszának felel meg, mert ez stabilizálná a kis fragmentumot. Mivel az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódása spontánul is végbemegy, a szarkomeren belüli folyamat jobb megértéséhez további kísérletek szükségesek, melyek közül a legfontosabb a szóban forgó rövid aktin filamentumok vizualizálása. Mindamellett megjegyzendő, hogy az említett Fhod3 formin típusú fehérje, amely a miofibrillumok fenntartásában és érésében játszik szerepet (Iskratsch és mtsai. 2010; Kan-O és mtsai. 2012), szintén lokalizálódik a mínusz végek közelében (Taniguchi és mtsai. 2009; Kan-O és mtsai. 2012), és ezért elképzelhető, hogy az aktin filamentumok összeszerelődését a dDAAM-hoz hasonló módon szabályozza.

A vékony filamentum növekedéssel foglalkozó korábbi modellek azt az elképzelést támogatták, hogy a növekedés egy kétlépéses mechanizmus során valósulhat meg (Bai és mtsai. 2007; Mardahl-Dumesnil és Fowler 2001). Ennek megfelelően az első lépésben rövid filamentumok képződnek, majd ezek a filamentumok csak a második lépésben érik el a végleges

hosszúságukat. Ezenfelül azt feltételezik, hogy - legalábbis a lárvális izmokban - az első lépés a SALS fehérje közreműködése nélkül történik, míg a rákövetkező lépésben a mínusz vég felőli elongációhoz már szükség van a SALS működésére, amely a Tropomodulin capping aktivitását szünteti meg (Bai és mtsai. 2007). A *dDAAM* mutánsban megfigyelt szarkomer rövidülés amellettszól, hogy a dDAAM fehérjére az említett vékony filamentum növekedési modell második lépésében lenne szükség. Másrészt, a súlyos Z-korong szerveződési defektusok és a csökkent szarkomer szám a lárvális izmokban mind arra utal, hogy a dDAAM-nak egy korai szerepe is lehet, és ez a szerep kapcsolódik a vékony filamentumok kialakulásának kezdeti lépéséhez. A C2C12 sejtdifferenciációs kísérletben az mDaam1 fehérje lokalizációs adatai is összhangban vannak a korai funkciót illető feltételezéssel. Ezért a dDAAM egy jó jelöltnek tűnik ahhoz, hogy részt vehessen a szarkomerikus vékony filamentumok kialakulásának első lépéseiben. Az viszont továbbra is nyitott kérdés marad, hogy az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódása az aktin filamentumok nukleációjának/elongációjának kezdeti, -második vagy mindkét lépésében megtörténhetne.

Érdekes módon, a vékony filamentumok kialakulására gyakorolt erős hatáson kívül, a dDAAM a vastag filamentumok és a rendezett miofibrilláris struktúra szerveződését is befolyásolja. Habár ezek a fenotípusok a vékony filamentum rendszer súlyos károsodásának indirekt következményeként is felléphetnek, egy másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy a dDAAM-nak jóval komplexebb szerepe van a szarkomerogenezisben. Emellettszól például az a megfigyelés, hogy a *dDAAM* mutánsokban a filamentum rendszerek szerveződése sokkal jobban károsodott, mint az *Act88F* null mutánsok esetén, pedig az utóbbiakból teljesen hiányoznak a vékony filamentumok (Beall és mtsai. 1989). Ráadásul, ezeknek a vékony filamentumoknak a hiánya ellenére, az *Act88F* mutánsok indirekt repülőizmában azt találtuk, hogy a dDAAM

fehérje továbbra is kötődött a miofibrillumokhoz, egy eléggé specifikus festődési mintázatot mutatva, amely nagyrészt az izom típusú miozin immunfestéssel kolokalizált (**35. ábra D**). A mutáns izmokat Western blot analízissel tovább vizsgálva azt találtuk, hogy a dDAAM fehérje mennyisége nem változott a vad típushoz képest (**35. ábra E**). Figyelemre méltó az is, hogy az aktin izoformák túltermelésével ellentétben (Röper és mtsai. 2005), a dDAAM fehérje túltermelése a lárvális izmokban szignifikánsan megnövelte a szarkomerek számát és az izom méretét, miközben a szarkomer hossz a vad típushoz közeli értéket mutatott. A fenti megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a vékony filamentum nukleáló/elongáló szerepe mellett, a dDAAM a szarkomerogenezis során az aktin és miozin filamentumrendszerek koordinálásában is lényeges szerepet játszik. Mindent összevetve egyértelmű, hogy a dDAAM-nak meghatározó szerepe van a szarkomer összeszerelődésben, és tudomásunk szerint ez az egyetlen ismert fehérje, amelynek izomspecifikus túltermelése ilyen látványos hatást gyakorol az izomfejlődésre.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált *Drosophila* törzsek

*w*¹¹¹⁸ mint vad típusú kontroll

dDAAM^{Ex1}

dDAAM^{Ex68} / *FM7c*, *Kr-GFP*

w; *UAS-FLDAAM* vagy *UAS-DAAM-PB*

yw; *DMef2-Gal4*

w; *UH3-Gal4*

w; *UAS-Dcr2*

*ry*⁵⁰⁶ *tmod*⁰⁰⁸⁴⁸ / *TM3*

w; *UAS Tmod*

*ry*⁵⁰⁶ *Act88F*^{KM88} *e*

yw; *Tm2*³

*ry*⁵⁰⁶ *Tm1*⁰²²⁹⁹ / *TM3*

w; *sals*^{f07849} / *TM6B*

w *Act5*^{CG0025} / *FM7c*

w; *sls-GFP*

w; *UAS-Tmod*^{RNAi} (NIG-FLY, Kyoto)

w; *UASdDAAM*^{KK102786} (VDRC, Bécs)

Az *UAS-dDAAM*^{RNAi-T129M} *dDAAM* specifikus RNS interferenciás vonal, amely az RE67944 *dDAAM* cDNS klónon a 2562 - 3068 nukleotid közötti szakaszt célozza meg, a standard klónozási és transzformációs módszerekkel készült. Az *UAS-DAAM-PD* klón készítéséhez a PD izoforma specifikus régiót amplifikáltunk fel olyan cDNS állományból, amely

reverz transzkripcióval az L3-as stádiumú lárva mRNS készletből lett generálva. Először egy pENTR3C-DAAM-PD klónt hoztunk létre, amelyet később arra használtunk, hogy a transzgenézisre megfelelő cél vektorokat, pTW-DAAM-PD (UAS-DAAM-PD) állítsunk elő. Az *UAS-DAAM-PB*^{I732A} és az *UAS-DAAM-PD*^{I1042A} mutánsokat a standard klónozási módszerekkel hoztuk létre, templátként használva a pENTR3C-DAAM-PB és a pENTR3C-DAAM-PD klónokat az *in vitro* mutagenézises kísérletekhez.

Az *in situ* C-terminálisan GFP-jelölt *dDAAM*^{EGFP} (*knock-in*) allélt egy kétlépéses P-elem mediálta génkonverziós kísérlettel hoztuk létre. Első lépésben egy úgynevezett targetáló konstrukció lett összeszerelve. Ehhez egy módosított pBS vektort használtunk, amelybe beépítettünk egy 1,3 kilobázisos szakaszt a *dDAAM* 3' végének genomikus régiójából egészen az utolsó kodonig. Ezt követte egy 2,3 kilobázisos Gal4::VP16 fragment, mindkét oldalán I-SceI hasító helyekkel határolva. Ezután egy 1150 bázispár hosszú fúziós fragmentet építettünk be, amely a *dDAAM* 3' végének utolsó 83 aminosavát tartalmazta egy EGFP kódoló szekvenciához fuzionáltatva, és stop kodonnal ellátva. Végül az egész 3' nem transzlálódó (UTR) régió és az ezt követő downstream 1,1 kilobázisos genomi régió is beépítésre került. Ily módon, a körülhatároló genomi szekvenciákon kívül, a konstrukció hordozta a Gal4::VP16 marker gént, amelyet I-SceI hasítóhelyek és egy megközelítőleg 250 bázispár hosszú genomi duplikáció határolt. A duplikáció a *dDAAM* gén C-terminális végének legutolsó kódoló szekvenciáit tartalmazta.

Ez a targetáló konstrukció lett a *dDAAM* genomi régiójába konvertálva, miután az *EP (I) 1542* nevű P-elemet remobilizáltuk. (A P-elem inszerció a *dDAAM*-tól 200 bázispár távolságra downstream helyezkedik el). A remobilizálás céljából az *EP (I) 1542* szüzeket *ry*⁵⁰² *Fab-7^l Δ2-3* (dr. Sipos László, MTA SZBK, ajándéka) hímekhez kereszteztük és az embrionális utódokat a targetáló konstrukcióval injektáltuk. Ezeket az utódokat aztán nagyszámú *w; UAS-EGFP*

legyekhez kereszteztük és a keresztezéseket szén és agar tartalmú táptalajon petéztettük. Az embriókat legyűjtöttük, és a frissen kikelő lárvákon MZ FLIII sztereó mikroszkóp (Leica, Svájc) segítségével GFP fluoreszcencia szűrést (screen) végeztünk. Azokat a lárvákat, amelyek tracheájában és idegrendszerében magas GFP expressziót tapasztaltunk, törzsalapításra használtuk fel. A génkonverziós esemény megvalósulását PCR-rel és szekvenálással igazoltuk. Ahogy a Gal4::VP16-ot tartalmazó konstrukció a konverzió folyamán sikeresen beépült a *dDAAM* génbe, a következő keresztezés során I-SceI segítségével kettős szálú DNS törést indukáltunk. Ennek a kettősszálú törésnek a javítása pedig nagy valószínűséggel a ~ 250 bázispárt tartalmazó duplikált *dDAAM* régiók közötti homológ rekombinációval történhetett meg. Ez az esemény, melyet PCR-rel és szekvenálással igazoltunk, az EGFP szakasz kivételével az összes nem *Drosophila* szekvencia eltávolításához vezetett, minek eredményeképpen egy C-terminálisan jelölt *dDAAM* allélt kaptunk. A *dDAAM*^{EGFP} allél életképes és fertilis homo-, illetve hemizigóta formában is, ami azt jelzi, hogy az EGFP jelenléte nem befolyásolja szignifikánsan a *dDAAM* fehérje funkcióját.

5.2. Immunhisztokémia

A frissen kikelt adultok IFM-jének boncolását foszfát pufferben (PBS) hígított 4%-os paraformaldehidben (PF) végeztük, majd fixálás céljából 15 percig inkubáltuk az oldatban. Ezután a fixált mintákat relaxáló oldatban (6 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM ATP, 90 mM kálium-propionát, 20 mM NaPi, pH 7.0) mostuk háromszor 30 percig. A mosás után az izmokat éjszakán át (kb. 18h) 4°C-on Triton-X/glicerin oldatban (50% v/v glicerin, 0.5% Triton X-100, 20 mM NaPi, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, pH 7.0) permeabilizáltuk majd újabb mosás után relaxáló oldatban hígított elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal festettük. A „frissen kikelt” adult legyek kategóriájába a kikelés után számított 0 és 8 óra közötti muslicák tartoztak.

A báb IFM boncolás esetén, miután az időzített állatokat eltávolítottuk a bábtokból, a fejüknél fogva rovartüvel a hátoldalukra fektetve Sylgard (Dow Corning) lemezre rögzítettük, majd PBS-ben hígított 4%-os PF fixálót mértünk rájuk. Miután a hasi középvonal mentén felvágtuk, a gyengébben kötődő zsírtesteket egy fecskendő segítségével öblítéssel eltávolítottuk, hogy az IFM-hez hozzájussunk. Ezeket leválasztottuk, fixálóban inkubáltuk (PBS-ben hígított 4%-os PF) 15 percig, majd relaxáló oldatban mostuk. A báb fejlődési stádiumok pontos időzítéséhez az úgynevezett fehér „előbábokat” (prepupa) friss fiolákba helyeztünk, majd ezeket 25°C-on tárolva a kívánt időpontokban gyűjtöttünk le.

A lárvális szívcső boncolásnál relaxáló oldatban metszettük fel a lárvák testfalát, majd ezeket PBS-ben hígított 4%-os PF-ben fixáltuk (az Alayari és mtsai. 2009-ben leírtak szerint). Miután a zsírtesteket és a belső szerveket eltávolítottuk, előzetes mosás után a szívcső preparátumokat PBS-BT-vel (PBS, 0,1% Triton-X, 0,2% BSA) minimum 1 órát blokkoltuk. E lépés során a BSA telíti a fehérjekötő helyeket, így az immunhisztokémiai eljárás alatt az antitest specifikusabban kötődik. A blokkolt mintákat éjszakán át (kb. 18h) festettük 4°C-on PBS-BT-ben megfelelő koncentrációra kihígított elsődleges ellenanyaggal, majd 0,1% Triton X-100-t tartalmazó PBS-ben (PBS-T) mostuk háromszor 30 percig. Ezután szobahőmérsékleten a fluoreszcens másodlagos ellenanyagot tartalmazó PBS-BT-ben 3 órát inkubáltuk (a fluoreszcens festésnél az inkubáció sötétben zajlik). Ezt háromszor 30 percig tartó mosás követte. Utolsó lépésként a mintákat gicserin:PBS 4:1 arányú keverékében helyeztük tárgylemezre, és fedőlemezzel lefedve Olympus FV1000 LSM konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópiás képeket az ImageJ (NIH) és az Olympus FW10-ASW (1.7a. verzió) szoftverek segítségével szerkesztettük.

5.2.1. Felhasznált elsődleges ellenanyagok

anti- α -aktinin – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:80 (Sigma)

α -DAAM (R4) - nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:1000 (Matusek és mtsai. 2006)

α -mDaam1 – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:2000 (Sigma)

α -mDaam1 – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:200 (Abnova)

α -EGFP – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:1000 (Invitrogen)

α -glikogén-foszforiláz – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:20000 (Udvardy A. jóvoltából)

α -Kettin – patkányban termelt, felhasznált hígítás: 1:200 (MAC 155, Abcam)

α -Miozin – patkányban termelt, felhasznált hígítás: 1:200 (MAC 147, Abcam)

α -Miomezin – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:1 (B4, DSHB)

α -Titin – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:20 (9D10, DSHB)

5.2.2. Felhasznált másodlagos ellenanyagok

Egérben termelt ellenanyagra specifikus:

α -egér-A1-546, felhasznált hígítás: 1:600 (Invitrogen)

Patkányban termelt ellenanyagra specifikus:

α -patkány-A1-488, felhasznált hígítás: 1:600 (Invitrogen)

α -patkány-A1-647, felhasznált hígítás: 1:600 (Invitrogen)

Nyúlban termelt ellenanyagra specifikus:

α -nyúl-A1-488, felhasznált hígítás: 1:600 (Invitrogen)

α -nyúl-A1-647, felhasznált hígítás: 1:600 (Invitrogen)

α -nyúl-HRP-konjugált, felhasznált hígítás 1:10000

5.2.3. Felhasznált egyéb reagentek

Rodamin-falloidin, felhasznált hígítás: 1:50 (Invitrogen)

DAPI (100µg/ml), felhasznált hígítás: 1:500

5.3. Lárvális testhossz és mászási sebesség mérések

A hasonló korú lárvákat legyűjtöttük, csapvízzel mostuk, majd szén és agar tartalmú táplemezre helyeztük őket. A lemezeket az Olympus SZX12 boncoló mikroszkóp alá helyeztük, amely Olympus C7070 digitális kamerával volt ellátva. Teljes megvilágítást használva a felvételeket 25 Hz frekvencián készítettük. A környezeti tényezők (hőmérséklet, páratartalom, megvilágítás), állandóak voltak. Minden vizsgált lárvát mozgásáról 20 másodpercig tartó film készült DScaler (The DScaler Project Team) program segítségével. Ez az időtartam elégségesnek bizonyult ahhoz, hogy a lárvák többsége a látótéren kívül kerüljön. A felvett képsorozatok kiértékelése az ImageJ (NIH) szoftver segítségével valósult meg. A lárvák egyenes vonalú egyenletes mozgását használtuk fel arra, hogy a lárvális testhosszt és a mászási sebességet megmérjük. A lárvális testhosszt a fej és a farok közötti minimális és maximális távolság átlaga alapján számítottuk ki. A lárvális mozgás útvonalát az egymásra szuperponált képekből rekonstruáltuk. A mászási sebességet pedig a megtett út és az eltelt idő hányadosaként számoltuk ki. A vizsgált lárvákat kiboncoltuk, testfal izmaikat immunfestettük, és az összehasonlító mérésekhez izom modellként a 3-as számú ventrális hosszanti testfal izmot (VL3) választottuk. Az izomhossz méréseket manuálisan végeztük a VL3-as izom leghosszabb tengelye mentén. Az izmok szélességét erre merőlegesen, az izom középvonalában mértük. A szarkomer számot és a szarkomer hosszt a falloiddinnal festett izmok intenzitás profiljából számoltuk, ahol a szarkomer hossz pontosan megfelelt az intenzitás profilban megjelenő két szomszédos csúcs közötti távolságnak.

5.4. Repülési teszt

A repülési tesztet három napos muslicákon végeztük (Cripps és mtsai. 1994 –ben leírtak szerint). A legyeket egy téglalap alakú átlátszó műanyag doboz oldalának középrészén engedték be. A doboz fölé fényforrást helyeztünk. A röpképes legyek a középrész fölé vagy azzal egy vonalban szálltak le a doboz falára. A röpképtelenek a középvonal alatti részre vagy a doboz aljára kerültek.

5.5. Sejtkultúrák és egér izom preparátumok előkészítése

Az egér miogenikus C2C12 (ATCC) sejtvonalat 10%-os FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban tartottuk fenn (GIBCO/Life Technologies). A sejteket kezdetben 100 mm átmérőjű csészékbe (Greiner) szélesztettük $10^4/\text{cm}^2$ -es sűrűségben. Amikor a sejtenyészlet konfluenciája elérte a $\sim 80\%$ -os értéket, a sejteket steril üveg fedőlemezekre ültettük ki, majd ezeket 35 mm átmérőjű csészékbe helyeztük. A sejtkultúrákat tápfolyadékban tartottuk, amíg a $\sim 60\%$ -os konfluenciát el nem érték, ezután 2%-os lószérumot tartalmazó differenciációs médiumba (DMEM; GIBCO/Life Technologies) kerültek. Ezt a médiumot mindennap cseréltük, és a megfelelő időpontokban a mintákat immunfestésre készítettük elő. A fedőlemezekon növesztett sejteket 4% formaldehid PBS oldatban 10 percig fixáltuk szobahőn, majd háromszor 10 percig PBS-sel mostuk. A mosás után PBS-T-vel 3 percig permeabilizáltuk, majd ismét háromszor 10 perces PBS-sel való mosás következett. Ezután a permeabilizált sejteket PBS+5% FBS oldatában 1 óráig blokkoltuk szobahőn az immunfestés előtt. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal PBS+5% FBS-ben inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőn. A két inkubáció között, illetve az utolsó inkubáció után háromszor 10 perces PBS-sel való mosást iktattunk be. Az utolsó lépések megegyeznek az immunhisztokémiai festésnél leírtakkal. A *m. tibialis anterior* és *m. vastus lateralis* izommetszetek készítéséhez C57Bl/6 adult hím egeret használtunk. A

lábizmokat kiboncoltuk, Tissue-Tek O.C.T. anyagba (Sakura Finetek) ágyasztuk, majd folyékony nitrogénnal hűtött izopentánban gyorsfagyasztottuk. A 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket előre lehűtött acetonban fixáltuk és -80°C-on tároltuk. A további immunhisztokémiai lépések megegyeztek a korábban leírtakkal.

5.6. Elektronmikroszkópos analízis

A kiboncolt izmok 4°C-on éjszakán át 3,2% paraformaldehid, 0,5% glutáraldehid, 1% szukróz, és 0,028% CaCl₂-ot tartalmazó 0.1 N-os nátrium kakodilát (pH 7.4) oldatban fixáltuk, és kétszer mostuk 0.1 N-os nátrium kakodilát (pH 7.4) oldatban éjszakán át 4°C-on. A mintákat utólagosan is fixáltuk 0,5%-os ozmium-tetroxidban szobahőn 1 órát, és a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően Durcupan (Fluka) műgyantába ágyasztuk. A genotípusonként 2-3 állatból származó 70-80 nm-es ultravékony metszeteket Reynold's féle ólom citráttal kontrasztosítottuk, majd Morada kamerával felszerelt és iTEM (Olympus) szoftverrel rendelkező JEM 1011 típusú (JEOL) transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

5.7. Atomerő-mikroszkópos mérések

Az egyedi miofibrillumokat poly-L-lizinnel bevont tárgylemezekre helyeztük PBS pufferben. A rugalmasság mérési pontok kiválasztása érdekében minden mintáról egy alacsony felbontású topográfiát készítettünk. A mérésekhez egy Asylum MFP-3D fejet és Molecular Force Probe típusú atomerő mikroszkópot (Asylum Research, Santa Barbara, CA) használtunk, melynek vezérlő programja IGOR Pro (5.04-es verzió, Wavemetrics, Lake Oswego, OR) szoftverben készült. Méréseinkhez arannyal bevont szilícium nitridből készült 30pN/nm-es rugóállandójú konzolon elhelyezett, Bio-Lever (BL-RC150 VB-C1, Olympus Optical Co. Ltd) típusú tűket használtunk, melyeknek görbületi sugara 30 nm. Kísérleteinket folyadékban, zárt hurkos visszacsatolású kontakt módban végeztük. A tű függőleges irányú sebessége 0.6µm/s (0.1

Hz-es mintavételezési frekvenciával), valamint a minta teljes terhelése 1nN alatt volt. Erő – elmozdulás görbéket készítettünk a következő módon: a tűt a minta felszínéhez közelítettük a beállított elhajlás eléréséig, majd visszahúztuk, miközben a függőleges elmozdulást, valamint a konzol elhajlását mértük. A minta rugalmassági modulusát az erőgörbék közelítő ágának kontakt és maximális elhajlási pontok közé eső szakaszából számoltuk, egy kemény felszínen felvett „referencia” görbe levonása után (a Vinckier és Semenza 1998 –ban leírtak szerint). Mintánként a különböző pontokon felvett több erő-benyomódás görbéből számolt átlagot, valamint a szórást (s.d.) ábrázoltuk.

5.8. Western-blot

Az adult IFM mintákat a fent leírtak szerint boncoltuk. A szöveteket rögtön proteáz inhibítort tartalmazó jéghideg RIPA lízis pufferbe helyeztük, és éjszakán át lizáltuk. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis és a Western-blot analízis a standard protokolloknak megfelelően zajlott. A membránokat α -DAAM (R4) ellenanyaggal festettük, kontrollként α -glükogén-foszforylázst használtunk. Másodlagos ellenanyagként HRP-konjugált α -nyúl ellenanyagot használtunk. A membránokat Millipore ImmobilonTM kemilumineszcens detekciós reagenssel hívtuk elő.

5.9. Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata

Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálatához fluoreszcens mikroszkópiát használtunk. Az aktin filamentumokat (10 μ M, F-aktin) szobahőmérsékleten 2 órán keresztül polimerizáltuk a következő F-puffernek nevezett oldatban: 4 mM Tris-HCl, 0,1 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl és 1 mM EGTA pH 7.0. Ezután az F-aktin oldatot F-puffer segítségével 1 μ M-ra hígítottuk a következő aktin kötő fehérjék jelenlétében vagy hiányában: 100 nM capping fehérje, 100 nM dDAAM FH1-FH2

csenkolt fehérje, 1 μ M vázizom TM, 100 nM dDAAM FH1-FH2 és 1 μ M vázizom TM. A mintákat éjszakán át inkubáltuk, majd egy órán át jelöltük Alexa 488 konjugált falloidinnel, és egy 26G méretű inzulinos fecskendőn átnyomva mechanikailag összetörtük a filamentumokat. Ezt követően a mintákat százszorosára hígítottuk az úgynevezett mikroszkópos pufferben (4 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 M DTT, 15 mM glükóz, 20 μ g/ml kataláz, 100 μ g/ml glükóz-oxidáz, 0.5 % (w/v) metilcellulóz, pH 7,0) a vég-vég kapcsolódás folyamatának leállítására. A kapott képeket ImageJ (NIH) program segítségével kiértékeltek. A 3-4 független kísérlet során megközelítőleg 300-600 filamentum hosszát mértük le egy adott minta esetén, és az átlagos filamentum hosszúságot az idő függvényében ábrázoltuk. A filamentumokat Olympus IX81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, 100x objektívet (NA 1.4) és egy CCD kamerát (Orca ERG Hamamatsu) használva. A statisztikai analízishez Microsoft Excel-t vagy Microcal Origin 6.0 programot használtunk.

5.10. Statisztikai analízis

Az eredmények számszerűsített adatainak összegyűjtéséhez és kezeléséhez Excel-t (Microsoft) használtunk. A statisztikai analízist Prism 5 (GraphPad Software Inc.) és/vagy SigmaPlot 12 (Systat Software Inc.) szoftverek segítségével végeztük. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A páronkénti összehasonlításokhoz a normalitás függvényében a Student's *t* tesztet vagy a Mann-Whitney *U* tesztet használtuk. A $p < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

6. FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK

AEL – After Egg Laying

AFM – Atomic Force Microscope

APF – After Puparium Formation

Arp – Actin-related protein

CC – Coiled-Coil domén

CNS – Central Nervous System

Cobl – Cordon-bleu

DAAM – Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis

DAD – Diaphanous Autoregulatory Domain

DD – Dimerization Domain

dDAAM – *Drosophila* DAAM

Dia - Diaphanous

DID – Diaphanous Inhibitory Domain

DLM – Dorsolongitudinal muscle

DRF - Diaphanous related formin

DVM – Dorsoventral muscle

ECM – Extracellular matrix

Ena – Enabled

F-aktin – filamentáris aktin

FH1 – Formin Homology 1

FH2 – Formin Homology 2

FRL – Formin-related proteins identified in Leukocytes

G-aktin – globuláris aktin monomer

GBD – GTPase-binding Domain

GFP – Green Fluorescent Protein

IFM – Indirect Flight Muscle

Lmod – Leiomodin

LOF – Loss of Function

MHC – Myosin Heavy Chain

MLCK – Myosin Light Chain Kinase

NMM – Non-muscle Myosin

Obsc – Obscurin

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCP – Planar Cell Polarity

RGD - Arginylglycylaspartic acid

SALS - Sarcomere Length Shortening

Scar - Suppressor of cAMP receptor

TM – Tropomyosin

Tmod – Tropomodulin

Tn – Troponin

WASP – Wiscott-Aldrich Syndrome Protein

WAVE - WASP-family Verprolin-homologous protein

WH2 - WASP Homology 2

ZASP - Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az izom differenciációt érintő fontos kérdés, hogy a harántcsíkolt izomsejt hogyan képes egy szabályosan ismétlődő, szigorúan rendezett szarkomerekből álló szerkezetet létrehozni a miofibrillogenezis során, más szóval, hogyan zajlik a szarkomer összeszerelődés?

A miofibrillogenezis sok lépésből álló, bonyolult folyamat, és ennek a folyamatnak kitüntetett része a miozin és aktin filamentumok összeszerelődése. Annak ellenére, hogy a szarkomerikus komplexek szerkezeti felépítését sikerült tisztázni, az előbb említett filamentum rendszerek *in vivo* összeszerelődéséről keveset tudunk. Különösen arra nem sikerült ez idáig még fényt deríteni, hogy hogyan zajlik a vékony filamentumok kezdeti összeszerelődése, milyen módon megy végbe az aktin dinamika szabályozása, és hogyan szerveződnek a filamentumok a miofibrillogenezis illetve a miofibrillumok fenntartása során. Habár az aktin nukleációs faktorok működését a különböző modellrendszerekben már régóta tanulmányozzák, az a fehérje, amely a fejlődő izmokban lehetővé tenné a nukleációt, még nem ismeretes. A nukleáción kívül az aktin dinamika fontos összetevői a filamentumok elongációja és a hosszúságuk szabályozása. A harántcsíkolt izmok vékony filamentumainak elongációját tanulmányozva azt találták, hogy a nem-izom sejtekkel ellentétben az *in vivo* monomer beépülés nem csak a plusz végen történik, hanem a mínusz vég irányából is. Ráadásul az elongáció sebessége nagyobb a mínusz végen, mint a plusz végen. Ez a megfigyelés meglepő, mert a mínusz vég elongáció *in vivo* teljesen ismeretlen a szakirodalomban, és eddig még nem írtak le mínusz vég elongáló faktorokat.

A dDAAM fehérje lokalizációját vizsgálva megállapítottuk, hogy a fehérje az IFM szarkomerein belül a vékony filamentumok mindkét végén, a Z-korongok és az M-vonal környékén is lokalizálódik. A különböző *dDAAM* mutánsok esetében az IFM-ben levő dDAAM fehérje szint csökkentésével arányosan nőtt a röpképtelen legyek aránya. A legmarkánsabb

fenotípust úgy értük el, hogy a részlegesen dDAAM hiányos $dDAAM^{Ex1}$ -es legyekben csendesítettük a $dDAAM$ gént ($dDAAM^{Ex1}$, UDT). Western blot analízis segítségével igazoltuk, hogy a röpképtelen fenotípus erőssége megegyezett a dDAAM fehérje szintjének az IFM-ben tapasztalt csökkenésével mind a $dDAAM^{Ex1}$ -es mind pedig az $dDAAM^{Ex1}$, UDT genotípusú állatok esetében. Azt pedig, hogy ezek a fenotípusok valóban a dDAAM szintjének csökkenéséhez köthetőek, a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével elvégzett menekítési kísérlettel bizonyítottuk. A legnagyobb dDAAM hiánnyal rendelkező $dDAAM^{Ex1}$, UDT legyek esetében pedig a legsúlyosabb IFM fenotípust figyelhettük meg. Ez az izomrostok egy részének elsovadását jelentette, a megmaradó miofibrillumok pedig vékonyabbak voltak a vad típusúaknál és a szervezetségüket is elvesztették. A szarkomer hossz rövidülése ezekben a miofibrillumokban elérte a 38%-ot. A bábállapot kialakulásától számított 48 órás $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok IFM-jében már megfigyelhetőek ugyanazok a fenotípusos elváltozások, amelyeket a fiatal felnőtt állatok esetében tapasztaltunk. Ami azt jelzi, hogy a fenotípus nem a fiatal adultok izmában bekövetkező aránytalan izomösszehúzódás eredménye. A $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok elektronmikroszkópiás analízisével igazoltuk és kiegészítettük a konfokális mikroszkópia által nyert eredményeket. A konfokális mikroszkópiával készült képeken nem láthattuk, hogy a vékony filamentumokon kívül a vastag filamentum rendszer szerveződése is súlyosan érintett. A vastag filamentumok ritkán párhuzamos lefutásúak, és a számuk kisebb a vad típuséhoz képest, ugyanakkor lazább szerveződésűek. Ennek a laza szerveződésnek a vizsgálatához atomerő mikroszkópiás elemzéseket is végeztünk, amelyek során sikerült kimutatnunk, hogy mind a $dDAAM^{Ex1}$ mind a $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok miofibrillumainak haránt irányú rugalmassága szignifikánsan alacsonyabb a vad típusénál. A DAAM fehérje lokalizációs megfigyeléseket kiterjesztettük más izmokra is. A fehérjét sikerült detektálni a

fejlődő és az adult szívcsőben és a lárvális testfal izmokban is. Embrionális és adult korú egér izommetszetek immunfestése után pedig azt tapasztaltuk, hogy az mDaam1 a *Drosophila* izmokban tapasztalt lokalizációs mintázathoz hasonló képet ad egér izmokban is, ami evolúciós konzerváltságra utal. Másrészt az egér sejt kultúrákban végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az mDaam1 a szarkomer kezdeményekben ugyanolyan korán jelenik meg, mint az aktin keresztkötő α -aktinin, ami azt jelenti, hogy ennek a formának korai szerepe van a miofibrillogenezis során.

A legnagyobb *dDAAM*^{Ex68} deficiencia allélt hordozó állatok egy része homo- illetve hemizigóta formában élél egészen a harmadik lárvastádiumig. Viszont a 100 órás mutáns lárvák testhossza sokkal rövidebb a vad típusú lárvákéhoz képest. A megfigyeléseink számszerűsítésére kiválasztott 3-as számú ventrális hosszanti testfal izom (VL3) hossza a mutáns lárvákban 53%-kal, a szélessége pedig 38%-kal csökkent a vad típushoz képest. A VL3-as izmok *dDAAM* mutánsokban megfigyelhető rövidülése két okra vezethető vissza, egyrészt a szarkomer hossz, másrészt a szarkomer szám is csökken ezekben a mutánsokban. A 100 órás mutáns lárvák mászási sebessége ~60%-kal csökkent a vad típushoz képest. Western blot analízissel kimutattuk, hogy az IFM-ben két különböző *dDAAM* izoforma expresszálódik: egy rövid (130 kD-os) és egy hosszú (163 kD), nagyobb mennyiségben jelen levő izoforma. Ezek méretük alapján megfelelnek a Flybase adatbázis által prediktált DAAM-PB (rövid izoforma), illetve DAAM-PD (hosszú izoforma) fehérjéknek. A menekítési kísérleteket külön elvégeztük mindkét izoformával. Az *UAS-DAAM-PB* expresszió a *dDAAM*^{Ex68}-as lárvák sebességvesztését csak részben, míg a testhosszát és izomméretét majdnem teljes mértékben menekíteni tudta. Az *UAS-DAAM-PD* expresszió pedig sikerült majdnem teljesen helyreállítania a vad típusra jellemző fenotípusos értékeket. A vad típusú konstrukciókkal ellentétben az aktin polimerizációra képtelen mutáns formák, az *UAS-DAAM-PB*^{I732A} és az *UAS-DAAM-PD*^{I1042A}, nem menekítették a

fenotípust. Sőt, az *UAS-DAAM-PD^{I1042A}* túltermelve domináns negatív formaként viselkedett a testhossz és a sebesség menekítése esetében. A mutáns háttéren végzett kísérleteken kívül a dDAAM konstrukciók vad típusú genetikai háttéren való túltermelését is elvégeztük. Az *UAS-DAAM-PB* és az *UAS-DAAM-PD* vad háttéren végzett izom-specifikus túltermelése a vad típusra jellemző testhossznál szignifikánsan hosszabb lárvákat eredményezett. Az izmok meghosszabbodásához az vezetett, hogy mindkét izoforma túltermelése esetén a szarkomerek száma szignifikánsan megnőtt a vad típushoz képest. Érdekes adat, hogy a PB izoformát túltermelő lárvák ~55%-al gyorsabban mozogtak a vad típusú társaiknál. A 100 órás *dDAAM^{Ex68}* mutáns lárvák csökkent testméretével összhangban a szívcsövük átmérője ~ 40%-kal kisebb a vad típushoz képest.

A *dDAAM* és az IFM specifikus *Act88F^{KM88}* és *Tm2³* allélok között erős genetikai kölcsönhatást találtunk, nem-izom sejt típusú izoformákkal pedig nem volt interakció, ami azt bizonyította, hogy a dDAAM fehérje funkciója az izomfejlődés során a szarkomerikus aktin filamentumok kialakításához kötődik.

Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy a dDAAM fehérjének van-e szerepe a vékony filamentumok mínusz vég felőli növekedésében, genetikai interakciós kísérleteket végeztünk két bizonyítottan mínusz vég szabályozó fehérje mutáns alléljaival, a SALS-al és a Tmod-al. A *sals^{f07849}* / + a *dDAAM^{Ex1}*-es mutáns háttéren nem okozott fenotípusbeli változást. Ezzel szemben a *tmod⁰⁰⁸⁴⁸* mutáció teljes mértékben szupresszálta a *dDAAM^{Ex1}* mutáns gyenge röpképtelen fenotípusát, visszaállítva a vad típushoz közeli értéket. Kimutattuk azt is, hogy az alacsonyabb dDAAM fehérjeszint szupresszálja a vékony filamentumok „túlnövekedési” fenotípusát, amelyet a *tmod^{RNSi}* muslicák indirekt repülőizmában láttunk.

Habár a dDAAM fehérje a szarkomerikus vékony filamentumok mínusz vége közelében is lokalizálódik, korábbi szerkezeti vizsgálatok azt jelzik, hogy a forminok kizárólag plusz vég kötő fehérjék. Ennek az ellentmondásnak a feloldására teszünk javaslatot egy olyan modellel, amelyben a mínusz vég felőli elongáció rövid aktin fragmentumok képződésén alapul, amelyek fokozatosan, oligomerként épülnek be a plusz végükkel a Z-koronghoz rögzített növekvő filamentumokba. Ebben a feltételezett modellben a dDAAM klasszikus plusz vég kötő fehérjeként működve rövid aktin fragmentumokat hozna létre, de emellett aktív módon is elősegítené a fragmentumok beépülését, vagy legalábbis nem gátolná azt. Hogy ezt a feltételezést igazolni tudjuk, egy *in vitro* F-aktin végillesztő aktivitási vizsgálatot végeztünk, melyben a dDAAM plusz vég kötő FH1-FH2 doménjeit használtuk. Azt találtuk, hogy az FH1-FH2 domén 100nM-os koncentrációban nem gátolta az aktin filamentumok végeinek az összeolvadását.

Az *mhc* és a *dDAAM* között az életképességet és az izomszerkezetet érintő domináns genetikai kölcsönhatást találtunk, ami arra utal, hogy a dDAAM az MHC fehérjével összehangoltan működik az izomfejlődés során, és úgy tűnik, hogy ez a kölcsönhatás a *dDAAM* aktin szabályozó funkciójától független. A *dDAAM^{Ex1}; zip²/+* kettős mutánsok esetében tapasztalt csökkent életképesség pedig azzal magyarázható, hogy a miozin/dDAAM kölcsönhatás a nem-izom sejtekben is fontos szerepet játszik.

Összefoglalásként elmondható, hogy a formin típusú fehérjékhez tartozó *Drosophila* DAAM részt vesz a vékony filamentumok kezdeti összeszerelődésében, illetve a vastag filamentumokkal való kölcsönhatás eredményeként a szarkomer szerveződésben is. Ezért a DAAM alcsaládba tartozó fehérjék jó jelöltnek tűnnek a régóta keresett izom típusú nukleációs és elongációs faktorok szerepére.

8. SUMMARY

The initial step of myofibril assembly is the formation of a regular array of sarcomeres. These sarcomeres later grow in width and in some cases in length, and eventually align and attach to each other and the sarcolemma. An important question in muscle differentiation is how the striated muscle cell produces these myofibrils with such regular arrays of sarcomeres. Whereas the structural properties of the sarcomeric complexes have been resolved in remarkable details over the past decades, much less is known as to how these cytoskeletal filament systems assemble *in vivo*. In particular, the initial assembly of thin filaments, the regulation of actin dynamics and organization during myofibril formation and maintenance remained poorly understood. Although the actin nucleation factors are heavily studied in a number of different model systems, the essential nucleation factors in developing muscles have so far not been clearly identified.

Besides nucleation, the other important aspects of actin dynamics are filament elongation and length regulation. It is thought that actin filament growth is primarily controlled by two antagonistically acting family of proteins, elongation factors and capping proteins. The elongation factors promote barbed end growth, whereas binding of the capping proteins block polymerization. The barbed and pointed ends of muscle thin filaments are lined up in regular arrays within each sarcomere. Contrasting to the situation in non-muscle cells where filament growth is restricted to the barbed end, sarcomeric actin filaments are thought to elongate from their pointed ends during myofibril assembly, although actin turnover is clearly evident at the barbed end as well. Because there is no protein isolated yet from any cell type that would catalyze actin assembly at the pointed end, the mechanism that enables muscle thin filament assembly, including the elongation from their pointed end, remained mysterious.

Our latest results revealed that, beyond its role in non-muscle cells, *dDAAM* plays a pivotal role in sarcomerogenesis. The dDAAM protein is enriched in several different types of muscles including the larval body wall muscles, the indirect flight muscle (IFM) and the heart tube. Our protein localization data are consistent with the idea that, although being a barbed end binding protein in non-muscle cells, dDAAM is both enriched in the vicinity of the barbed and pointed ends of the thin filaments in muscle cells. The lack of dDAAM causes a flightless phenotype, as 16% of adults homozygous for the viable, hypomorphic *dDAAM^{Ex1}* allele were flightless. Because *dDAAM* null alleles are homozygous lethal, we used two *dDAAM* specific RNAi lines (*KK102786* from VDRC and *T129M* constructed in our laboratory, targeting two non-overlapping parts of the mRNA) to verify the flight effect. In the presence of *UAS-Dicer2* and an IFM (indirect flight muscle) specific driver (*UH3-Gal4*), both RNAi lines produced strong flightless phenotypes. RNAi silencing in a *dDAAM* mutant background (*dDAAM^{Ex1}*, *UH3-Gal4*; *UAS-Dicer2*; *UAS-dDAAM^{RNAi-T129M}*, subsequently referred to as *dDAAM^{Ex1}*, *UDT*) caused nearly all males to be flightless. As we could show by the use of the Western blot analysis, the strength of the flightless phenotypes correlated with the partial reduction of dDAAM protein levels in *dDAAM^{Ex1}* IFM and its near absence in IFM from the RNAi genotypes. The flightless phenotype exhibited by *dDAAM^{Ex1}* mutants could be rescued by muscle-specific expression of the dDAAM protein.

The IFM from the *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutant combination showed the worst alterations in IFM fiber morphology. The myofibrils were thinner than in wild type and their organization was irregular. Mutant IFMs exhibited reduced F-actin staining without significant alterations in the amount of G-actin (showed by Coomassie staining). Additionally, phalloidin staining suggested that many of the thin filaments were of unequal length, and similar to *dDAAM^{Ex1}* mutants, shorter

sarcomeres could often be detected. The sarcomere length reduction in these myofibrils reached even 38%. M-lines could hardly be identified by Myosin immunostaining, while the Z-discs displayed a highly irregular and delocalized pattern compared to wild type. Thus, loss of *dDAAM* function impairs IFM structure from overall muscle shape to myofibrillar and sarcomeric organization. At 48 hours after puparium formation (APF) (at 29°C) the pupal IFM of *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* flies already showed all the muscle phenotypes observed in adults. These include irregular myofibrillar organization, reduced F-actin levels, lack of visible M-lines, disorganized, unequally spaced Z-discs and sarcomere shortening. These data suggest that the IFM phenotypes observed in newly hatched *dDAAM* mutant adults were likely to be a consequence of loss of *dDAAM* function during early muscle development. Electron microscopy (EM) of the IFM of *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutants confirmed and extended all the major myofibrillar defects seen in the confocal images. We could not detect with confocal microscopy that thick filaments rarely ran parallel to each other, the average thick filament number per sarcomere was strongly reduced compared to controls, and filament packing was much looser than wild type. To test whether the structural alterations observed in *dDAAM* mutant myofibrils affect their mechanical properties an Atomic Force Microscope (AFM) was used to measure the transverse elasticity of individual myofibrils in rigor conditions. The elasticity (Young's modulus) of *dDAAM^{Ex1}* and *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutant myofibrils was significantly lower than that of wild type.

The subsarcomeric localization of mDaam1 appears similar to that of *Drosophila* DAAM with regard to accumulation at the Z-disc and alongside the M-line, and this suggests an evolutionary conserved function. On the other hand, our experiments done on mice cell cultures

showed, that mDaam1 is recruited to sarcomeric complexes as early as the actin crosslinker α -actinin protein. Therefore this formin is likely to be an early determinant of myofibrillogenesis.

To ask whether *dDAAM* plays a role generally in muscle development, larval body wall muscles and the heart tube were examined. The body size and somatic musculature of *dDAAM^{Ex68}* null mutant early third instar (L3) appeared normal, but late in L3, 100 hours after eggs laying (AEL), the larvae were shorter than wild type. Measurements of the ventral longitudinal 3 (VL3) muscle showed a 53% length reduction and 38% width reduction in the mutants. Shortening of VL3 in *dDAAM* mutants arises both by sarcomere shortening and a reduction in sarcomere numbers. To investigate the physiological relevance of the muscular defects observed, we examined the larval motility of *dDAAM* mutant larvae. At 100 hours AEL their velocity was decreased by 60% compared to wild type. Western blot analysis revealed that the IFM expresses two dDAAM protein isoforms, a short (130 kD) minor isoform and a long (163 kD) major isoform. These correspond respectively to the predicted DAAM-PB and DAAM-PD proteins (Flybase annotation). The rescue experiments were performed with *UAS-DAAM-PB* as well as with *UAS-DAAM-PD*. *UAS-DAAM-PB* expression partly rescued the velocity decrease and almost fully rescued the body and muscle size of *dDAAM^{Ex68}* mutant larvae, whereas *UAS-DAAM-PD* expression almost completely rescued all the phenotypic traits. Unlike the wild type constructs, the actin polymerization incompetent mutant forms, *UAS-DAAM-PB^{I732A}* and *UAS-DAAM-PD^{I1042A}* mimicking the Bni1 I1431A mutation, failed to rescue. Muscle-specific expression of *UAS-DAAM-PB* and *UAS-DAAM-PD*, in a wild type background, produced significantly longer larvae than wild type. Muscle lengthening occurred by significantly increasing the sarcomere number. Interestingly, larvae expressing the PB isoform were 55%

faster than wild type larvae. Larval heart tube size was also reduced in 100 hour old *dDAAM*^{Ex68} mutants compared to wild type (40% reduction in diameter).

The strong dominant genetic interaction between *dDAAM* and the IFM-specific *Act88F* and *Tm2* alleles, and the complete lack of interaction with the non-muscle cell specific isoforms, suggests that the major function of dDAAM during muscle development is linked to the regulation of sarcomeric actin filament formation. To determine whether dDAAM is functionally important for pointed end elongation we investigated genetic interactions of *dDAAM* with mutations affecting the pointed end regulator proteins SALS and Tmod. The presence of *sals*^{f07849/+} in a *dDAAM*^{Ex1} mutant background had no obvious phenotypic effect. In contrast, the *tmod*⁰⁰⁸⁴⁸ mutation entirely suppressed the weak flightless phenotype of *dDAAM*^{Ex1}, suggesting that dDAAM and Tmod may act antagonistically during thin filament growth. We also showed, that the reduced dDAAM levels suppress the “over elongation” of the thin filaments seen in the IFM of *tmod*RNAi flies. Although dDAAM protein is detected in the vicinity of the pointed ends of sarcomeric thin filaments, former structural studies indicated that formins are strictly barbed end binding proteins. This paradox would be resolved if pointed end elongation relies on the formation of short actin filaments that anneal sequentially to growing thin filaments anchored to the Z-disc. In this model, dDAAM would mediate the assembly of short actin filaments by acting as a classical barbed end binding formin, but would additionally either actively promote actin filament annealing, or at least not block it. To test this expectation, an *in vitro* F-actin annealing assay was carried out with the barbed end binding FH1–FH2 domains of dDAAM. We found that the presence of the FH1–FH2 fragment (100 nM) allowed the end-to end annealing of actin filaments.

The dominant genetic interactions between *mhc* and *dDAAM* with respect to viability and muscle structure support the possibility that dDAAM acts in concert with Mhc during muscle development, and this interaction seems to be largely independent from the actin regulatory function of *dDAAM*. And the strongly reduced viability of the *dDAAM^{Ex1}; zip²/+* double mutants is best explained by assuming that the myosin/dDAAM interactions are important in non-muscle cells as well.

In conclusion, our results indicated that, beyond a role in actin regulation, *dDAAM* might also be required for the proper formation of the thick filaments and/or the integration of the major filamental systems into the greatly organized myofibrils. Therefore we propose that members of the DAAM family of formins are very good candidates for the long sought-after muscle actin/thin filament nucleators.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F. and Butler-Browne, G.** (2003). Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol. Cell* **95**, 399–406.
- Ahern-Djamali, S. M., Bachmann, C., Hua, P., Reddy, S. K., Kastenmeier, A. S., Walter, U. and Hoffmann, F. M.** (1999). Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4977–82.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.
- Andrianantoandro, E., Blanchoin, L., Sept, D., McCammon, J. A. and Pollard, T. D.** (2001). Kinetic mechanism of end-to-end annealing of actin filaments. *J. Mol. Biol.* **312**, 721–30.
- Ang, S.-F., Zhao, Z., Lim, L. and Manser, E.** (2010). DAAM1 is a formin required for centrosome re-orientation during cell migration. *PLoS One* **5**,.
- Au, Y.** (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 3016–33.
- Bai, J., Hartwig, J. H. and Perrimon, N.** (2007). SALS, a WH2-domain-containing protein, promotes sarcomeric actin filament elongation from pointed ends during *Drosophila* muscle growth. *Dev. Cell* **13**, 828–42.
- Bang, M.-L., Li, X., Littlefield, R., Bremner, S., Thor, A., Knowlton, K. U., Lieber, R. L. and Chen, J.** (2006). Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **173**, 905–16.
- Barkó, S., Bugyi, B., Carlier, M.-F., Gombos, R., Matusek, T., Mihály, J. and Nyitrai, M.** (2010). Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM. *J. Biol. Chem.* **285**, 13154–69.
- Bartolini, F., Moseley, J. B., Schmoranzer, J., Cassimeris, L., Goode, B. L. and Gundersen, G. G.** (2008). The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *J. Cell Biol.* **181**, 523–36.
- Bate, M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791–804.
- Bate, M. and Martinez Arias, A.** (1993). *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. **2**, pp. 1013–1090.
- Bate, M., Rushton, E. and Currie, D. A.** (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* **113**, 79–89.

- Beall, C. J., Sepanski, M. A. and Fyrberg, E. A.** (1989). Genetic dissection of *Drosophila* myofibril formation: effects of actin and myosin heavy chain null alleles. *Genes Dev.* **3**, 131–40.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A. and Pollard, T. D.** (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–11.
- Brand-Saberi, B.** (2005). Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann. Anat.* **187**, 199–207.
- Campellone, K. G. and Welch, M. D.** (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 237–51.
- Chalkia, D., Nikolaidis, N., Makalowski, W., Klein, J. and Nei, M.** (2008). Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 2717–33.
- Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P.** (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.* **137**, 169–82.
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D. B., Rebowski, G., Lappalainen, P., Pollard, T. D. and Dominguez, R.** (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* **320**, 239–43.
- Chesarone, M. a and Goode, B. L.** (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 28–37.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N.** (2006). INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J. Biol. Chem.* **281**, 26754–67.
- Chow, D., Srikakulam, R., Chen, Y. and Winkelmann, D. A.** (2002). Folding of the striated muscle myosin motor domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 36799–807.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. and Gregorio, C. C.** (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 637–706.
- Colombo, A., Palma, K., Armijo, L., Mione, M., Signore, I. A., Morales, C., Guerrero, N., Meynard, M. M., Pérez, R., Suazo, J., et al.** (2013). Daaml1a mediates asymmetric habenular morphogenesis by regulating dendritic and axonal outgrowth. *Development* **140**, 3997–4007.

- Cooper, J. A., Walker, S. B. and Pollard, T. D.** (1983). Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 253–62.
- Copeland, J. W., Copeland, S. J. and Treisman, R.** (2004). Homo-oligomerization is essential for F-actin assembly by the formin family FH2 domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 50250–6.
- Cripps, R. M., Ball, E., Stark, M., Lawn, A. and Sparrow, J. C.** (1994). Recovery of dominant, autosomal flightless mutants of *Drosophila melanogaster* and identification of a new gene required for normal muscle structure and function. *Genetics* **137**, 151–64.
- Currie, D. A. and Bate, M.** (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* **113**, 91–102.
- Demontis, F. and Perrimon, N.** (2009). Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development* **136**, 983–93.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–6.
- Dominguez, R.** (2009). Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 351–66.
- Ehler, E. and Gautel, M.** (2008). The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **642**, 1–14.
- Ervasti, J. M.** (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 13591–4.
- Etard, C., Behra, M., Fischer, N., Hutcheson, D., Geisler, R. and Strähle, U.** (2007). The UCS factor Steif/Unc-45b interacts with the heat shock protein Hsp90a during myofibrillogenesis. *Dev. Biol.* **308**, 133–43.
- Etard, C., Roostalu, U. and Strähle, U.** (2008). Shuttling of the chaperones Unc45b and Hsp90a between the A band and the Z line of the myofibril. *J. Cell Biol.* **180**, 1163–75.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M. and Boone, C.** (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118–22.
- Evangelista, M., Zigmond, S. and Boone, C.** (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* **116**, 2603–11.
- Fernandes, J., Bate, M. and Vijayraghavan, K.** (1991). Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* **113**, 67–77.

- Fritz-Six, K. L., Cox, P. R., Fischer, R. S., Xu, B., Gregorio, C. C., Zoghbi, H. Y. and Fowler, V. M.** (2003). Aberrant myofibril assembly in tropomodulin1 null mice leads to aborted heart development and embryonic lethality. *J. Cell Biol.* **163**, 1033–44.
- Fyrberg, E. A., Mahaffey, J. W., Bond, B. J. and Davidson, N.** (1983). Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* **33**, 115–23.
- Goley, E. D. and Welch, M. D.** (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 713–26.
- Gonçalves-Pimentel, C., Gombos, R., Mihály, J., Sánchez-Soriano, N. and Prokop, A.** (2011). Dissecting regulatory networks of filopodia formation in a *Drosophila* growth cone model. *PLoS One* **6**, e18340.
- Goode, B. L. and Eck, M. J.** (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 593–627.
- Grove, B. K., Kurer, V., Lehner, C., Doetschman, T. C., Perriard, J. C. and Eppenberger, H. M.** (1984). A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **98**, 518–24.
- Grunt, M., Zárský, V. and Cvrcková, F.** (2008). Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC Evol. Biol.* **8**, 115.
- Gunning, P.** (2008). Emerging issues for tropomyosin structure, regulation, function and pathology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **644**, 293–8.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X.** (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843–54.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M. and Walter, U.** (1995). Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO J.* **14**, 19–27.
- Harris, E. S. and Higgs, H. N.** (2006). Biochemical analysis of mammalian formin effects on actin dynamics. *Methods Enzymol.* **406**, 190–214.
- Harris, E. S., Li, F. and Higgs, H. N.** (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 20076–87.
- Harris, E. S., Rouiller, I., Hanein, D. and Higgs, H. N.** (2006). Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem.* **281**, 14383–92.

- Heuson-Stiennon, J.** (1965). Morphogenèse de la cellule musculaire striée, étudiée au microscope électronique. I. Formation des structures fibrillaires. *J. Microsc.* **1**, 657–678.
- Higashi, T., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kondo, H., Kawato, M., Horiguchi, M., Okuda, T., Okawa, K., Fukai, S., Nureki, O., et al.** (2008). Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *J. Biol. Chem.* **283**, 8746–55.
- Higgs, H. N.** (2005). Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 342–53.
- Higgs, H. N. and Peterson, K. J.** (2005). Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1–13.
- Holtzer, H., Hijikata, T., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Holtzer, S., Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. and Sweeney, H. L.** (1997). Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct. Funct.* **22**, 83–93.
- Hudson, A. M., Petrella, L. N., Tanaka, A. J. and Cooley, L.** (2008). Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps. *Dev. Biol.* **314**, 329–40.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y.** (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 2745–55.
- Iskratsch, T., Lange, S., Dwyer, J., Kho, A. L., dos Remedios, C. and Ehler, E.** (2010). Formin follows function: a muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. *J. Cell Biol.* **191**, 1159–72.
- Ju, R., Cirone, P., Lin, S., Griesbach, H., Slusarski, D. C. and Crews, C. M.** (2010). Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6906–11.
- Kaiser, D. A., Vinson, V. K., Murphy, D. B. and Pollard, T. D.** (1999). Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 2, 3779–90.
- Kan-O, M., Takeya, R., Abe, T., Kitajima, N., Nishida, M., Tominaga, R., Kurose, H. and Sumimoto, H.** (2012). Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol. Open* **1**, 889–96.
- Karlik, C. C. and Fyrberg, E. A.** (1985). An insertion within a variably spliced *Drosophila* tropomyosin gene blocks accumulation of only one encoded isoform. *Cell* **41**, 57–66.

- Katzemich, A., Kreisköther, N., Alexandrovich, A., Elliott, C., Schöck, F., Leonard, K., Sparrow, J. and Bullard, B.** (2012). The function of the M-line protein obscurin in controlling the symmetry of the sarcomere in the flight muscle of *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **125**, 3367–79.
- Kelly, D. E.** (1969). Myofibrillogenesis and Z-band differentiation. *Anat. Rec.* **163**, 403–25.
- Kida, Y., Shiraishi, T. and Ogura, T.** (2004). Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **153**, 143–50.
- Kim, J., Löwe, T. and Hoppe, T.** (2008). Protein quality control gets muscle into shape. *Trends Cell Biol.* **18**, 264–72.
- Kitzing, T. M., Sahadevan, A. S., Brandt, D. T., Knieling, H., Hannemann, S., Fackler, O. T., Grosshans, J. and Grosse, R.** (2007). Positive feedback between Dial, LARG, and RhoA regulates cell morphology and invasion. *Genes Dev.* **21**, 1478–83.
- Komiya, Y. and Habas, R.** (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C. and Bloch, R. J.** (2006). De novo myofibrillogenesis in C2C12 cells: evidence for the independent assembly of M bands and Z disks. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C626–37.
- Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L. and Pollard, T. D.** (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell Biol.* **161**, 875–87.
- Krone, P. H., Evans, T. G. and Blechinger, S. R.** (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 267–74.
- LeClaire, L. L., Baumgartner, M., Iwasa, J. H., Mullins, R. D. and Barber, D. L.** (2008). Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J. Cell Biol.* **182**, 647–54.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322–9.
- Lee, H. K. and Deneen, B.** (2012). Daam2 is required for dorsal patterning via modulation of canonical Wnt signaling in the developing spinal cord. *Dev. Cell* **22**, 183–96.
- Levitsky, D. I., Khvorov, N. V, Shnyrov, V. L., Vedenkina, N. S., Permyakov, E. A. and Poglazov, B. F.** (1990). Domain structure of myosin subfragment-1. Selective denaturation of the 50 kDa segment. *FEBS Lett.* **264**, 176–8.

- Lewkowicz, E., Herit, F., Le Clainche, C., Bourdoncle, P., Perez, F. and Niedergang, F.** (2008). The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDial and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* **183**, 1287–98.
- Li, F. and Higgs, H. N.** (2003). The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr. Biol.* **13**, 1335–40.
- Li, F. and Higgs, H. N.** (2005). Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDial. *J. Biol. Chem.* **280**, 6986–92.
- Li, D., Hallett, M. A., Zhu, W., Rubart, M., Liu, Y., Yang, Z., Chen, H., Haneline, L. S., Chan, R. J., Schwartz, R. J., et al.** (2011). Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development* **138**, 303–15.
- Lin, Z., Lu, M. H., Schultheiss, T., Choi, J., Holtzer, S., DiLullo, C., Fischman, D. A. and Holtzer, H.** (1994). Sequential appearance of muscle-specific proteins in myoblasts as a function of time after cell division: evidence for a conserved myoblast differentiation program in skeletal muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton* **29**, 1–19.
- Littlefield, R. S. and Fowler, V. M.** (2008). Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 511–9.
- Littlefield, R., Almenar-Queralt, A. and Fowler, V. M.** (2001). Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nat. Cell Biol.* **3**, 544–51.
- Liu, W., Sato, A., Khadka, D., Bharti, R., Diaz, H., Runnels, L. W. and Habas, R.** (2008a). Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 210–5.
- Liu, L., Srikakulam, R. and Winkelmann, D. A.** (2008b). Unc45 activates Hsp90-dependent folding of the myosin motor domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 13185–93.
- LoRusso, S. M., Rhee, D., Sanger, J. M. and Sanger, J. W.** (1997). Premyofibrils in spreading adult cardiomyocytes in tissue culture: evidence for reexpression of the embryonic program for myofibrillogenesis in adult cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**, 183–98.
- Lu, J., Meng, W., Poy, F., Maiti, S., Goode, B. L. and Eck, M. J.** (2007). Structure of the FH2 domain of Daam1: implications for formin regulation of actin assembly. *J. Mol. Biol.* **369**, 1258–69.
- Lymn, R. W. and Taylor, E. W.** (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617–24.

- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat. Genet.* **36**, 1019–23.
- Manseau, L. J. and Schüpbach, T.** (1989). cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **3**, 1437–52.
- Mardahl-Dumesnil, M. and Fowler, V. M.** (2001). Thin filaments elongate from their pointed ends during myofibril assembly in *Drosophila* indirect flight muscle. *J. Cell Biol.* **155**, 1043–53.
- Matusek, T., Djiane, A., Jankovics, F., Brunner, D., Mlodzik, M. and Mihály, J.** (2006). The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. *Development* **133**, 957–66.
- Matusek, T., Gombos, R., Szécsényi, A., Sánchez-Soriano, N., Czibula, A., Pataki, C., Gedai, A., Prokop, A., Raskó, I. and Mihály, J.** (2008). Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth. *J. Neurosci.* **28**, 13310–9.
- Maughan, D. W. and Vigoreaux, J. O.** (1999). An Integrated View of Insect Flight Muscle: Genes, Motor Molecules, and Motion. *News Physiol. Sci.* **14**, 87–92.
- McKeown, C. R., Nowak, R. B., Moyer, J., Sussman, M. A. and Fowler, V. M.** (2008). Tropomodulin1 is required in the heart but not the yolk sac for mouse embryonic development. *Circ. Res.* **103**, 1241–8.
- Michelot, A., Guérin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C. J. and Blanchoin, L.** (2005). The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell* **17**, 2296–313.
- Miller, G., Musa, H., Gautel, M. and Peckham, M.** (2003). A targeted deletion of the C-terminal end of titin, including the titin kinase domain, impairs myofibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **116**, 4811–9.
- Mi-Mi, L., Votra, S., Kempfues, K., Bretscher, A. and Pruyne, D.** (2012). Z-line formins promote contractile lattice growth and maintenance in striated muscles of *C. elegans*. *J. Cell Biol.* **198**, 87–102.
- Moerman, D. G. and Williams, B. D.** (2006). Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. *WormBook* 1–16.
- Molina, M. R. and Cripps, R. M.** (2001). Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech. Dev.* **109**, 51–9.

- Molnár, I., Migh E, Szikora S, Kalmár T, Végh AG, Deák F, Barkó S, Bugyi B, Orfanos Z, Kovács J, Juhász G, Váró G, Nyitrai M, Sparrow J and Mihály J.** (2014). DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in *Drosophila*. *PLoS Genetics*. **10**(2):e1004166.
- Moseley, J. B. and Goode, B. L.** (2005). Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J. Biol. Chem.* **280**, 28023–33.
- Moseley, J. B., Sagot, I., Manning, A. L., Xu, Y., Eck, M. J., Pellman, D. and Goode, B. L.** (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDial1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 896–907.
- Nakaya, M., Habas, R., Biris, K., Dunty, W. C., Kato, Y., He, X. and Yamaguchi, T. P.** (2004). Identification and comparative expression analyses of Daam genes in mouse and *Xenopus*. *Gene Expr. Patterns* **5**, 97–105.
- Nelson, K. S., Khan, Z., Molnár, I., Mihály, J., Kaschube, M. and Beitel, G. J.** (2012). *Drosophila* Src regulates anisotropic apical surface growth to control epithelial tube size. *Nat. Cell Biol.* **14**, 518–25.
- Niederman, R. and Pollard, T. D.** (1975). Human platelet myosin. II. In vitro assembly and structure of myosin filaments. *J. Cell Biol.* **67**, 72–92.
- Nongthomba, U., Clark, S., Cummins, M., Ansari, M., Stark, M. and Sparrow, J. C.** (2004). Troponin I is required for myofibrillogenesis and sarcomere formation in *Drosophila* flight muscle. *J. Cell Sci.* **117**, 1795–805.
- O'Donnell, P. T. and Bernstein, S. I.** (1988). Molecular and ultrastructural defects in a *Drosophila* myosin heavy chain mutant: differential effects on muscle function produced by similar thick filament abnormalities. *J. Cell Biol.* **107**, 2601–12.
- Okamoto, H., Hiromi, Y., Ishikawa, E., Yamada, T., Isoda, K., Maekawa, H. and Hotta, Y.** (1986). Molecular characterization of mutant actin genes which induce heat-shock proteins in *Drosophila* flight muscles. *EMBO J.* **5**, 589–96.
- Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M. and Rosen, M. K.** (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488–94.
- Pardo, J. V, Siliciano, J. D. and Craig, S. W.** (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements (“costameres”) mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1008–12.
- Paul, A. S. and Pollard, T. D.** (2009). Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 606–17.

- Pollard, T. D.** (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451–77.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. and Zigmond, S. H.** (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**, 486–96.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C.** (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612–5.
- Quach, N. L. and Rando, T. A.** (2006). Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev. Biol.* **293**, 38–52.
- Qualmann, B. and Kessels, M. M.** (2009). New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol.* **19**, 276–85.
- Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E. and Mullins, R. D.** (2005). Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**, 382–8.
- Quinlan, M. E., Hilgert, S., Bedrossian, A., Mullins, R. D. and Kerkhoff, E.** (2007). Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J. Cell Biol.* **179**, 117–28.
- Randall, D., Burggren, W. and Kathleen, F.** (2002). Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations, Fifth edition.
- Reedy, M. C. and Beall, C.** (1993). Ultrastructure of developing flight muscle in Drosophila. I. Assembly of myofibrils. *Dev. Biol.* **160**, 443–65.
- Rhee, D., Sanger, J. M. and Sanger, J. W.** (1994). The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* **28**, 1–24.
- Rizki, T. M. and Rizki, R. M.** (1978). Larval adipose tissue of homoeotic bithorax mutants of Drosophila. *Dev. Biol.* **65**, 476–82.
- Rosales-Nieves, A. E., Johndrow, J. E., Keller, L. C., Magie, C. R., Pinto-Santini, D. M. and Parkhurst, S. M.** (2006). Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat. Cell Biol.* **8**, 367–76.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M. R. and Wittinghofer, A.** (2005). Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* **435**, 513–8.
- Rosser, B. W., Wick, M., Waldbillig, D. M., Wright, D. J., Farrar, C. M. and Bandman, E.** (1998). Expression of myosin heavy chain isoforms during development of domestic pigeon pectoralis muscle. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 653–61.

- Röper, K., Mao, Y. and Brown, N. H.** (2005). Contribution of sequence variation in *Drosophila* actins to their incorporation into actin-based structures in vivo. *J. Cell Sci.* **118**, 3937–48.
- Rui, Y., Bai, J. and Perrimon, N.** (2010). Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. *PLoS Genet.* **6**, e1001208.
- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L. and Pellman, D.** (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* **4**, 626–31.
- Sanger, J. W., Wang, J., Fan, Y., White, J. and Sanger, J. M.** (2010). Assembly and dynamics of myofibrils. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 858606.
- Schnorrer, F. and Dickson, B. J.** (2004). Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* **7**, 9–20.
- Scholey, J. M., Taylor, K. A. and Kendrick-Jones, J.** (1980). Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature* **287**, 233–5.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I. R., Kühlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M. A. and Wittinghofer, A.** (2004). The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol. Cell* **13**, 511–22.
- Skau, C. T., Neidt, E. M. and Kovar, D. R.** (2009). Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2160–73.
- Skwarek-Maruszewska, A., Boczkowska, M., Zajac, A. L., Kremneva, E., Svitkina, T., Dominguez, R. and Lappalainen, P.** (2010). Different localizations and cellular behaviors of leiomodulin and tropomodulin in mature cardiomyocyte sarcomeres. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3352–61.
- Sparrow, J. C. and Schöck, F.** (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 293–8.
- Srikakulam, R. and Winkelmann, D. A.** (2004). Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *J. Cell Sci.* **117**, 641–52.
- Stevenson, T. O., Mercer, K. B., Cox, E. A., Szewczyk, N. J., Conley, C. A., Hardin, J. D. and Benian, G. M.** (2007). *unc-94* encodes a tropomodulin in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **374**, 936–50.
- Sussman, M. A., Baqué, S., Uhm, C. S., Daniels, M. P., Price, R. L., Simpson, D., Terracio, L. and Kedes, L.** (1998). Altered expression of tropomodulin in cardiomyocytes disrupts the sarcomeric structure of myofibrils. *Circ. Res.* **82**, 94–105.

- Swank, D. M., Braddock, J., Brown, W., Lesage, H., Bernstein, S. I. and Maughan, D. W.** (2006). An alternative domain near the ATP binding pocket of *Drosophila* myosin affects muscle fiber kinetics. *Biophys. J.* **90**, 2427–35.
- Taniguchi, K., Takeya, R., Suetsugu, S., Kan-O, M., Narusawa, M., Shiose, A., Tominaga, R. and Sumimoto, H.** (2009). Mammalian formin fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J. Biol. Chem.* **284**, 29873–81.
- Tetzlaff, M. T., Jäckle, H. and Pankratz, M. J.** (1996). Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *EMBO J.* **15**, 1247–54.
- Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J.-P. and Thisse, C.** (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol.* **77**, 505–19.
- Tokuyasu, K. T.** (1989). Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. III. Generation of fasciae adherentes and costameres. *J. Cell Biol.* **108**, 43–53.
- Trombitás, K., Greaser, M., French, G. and Granzier, H.** (1998). PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J. Struct. Biol.* **122**, 188–96.
- Tskhovrebova, L. and Trinick, J.** (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 679–89.
- Vaillant, D. C., Copeland, S. J., Davis, C., Thurston, S. F., Abdennur, N. and Copeland, J. W.** (2008). Interaction of the N- and C-terminal autoregulatory domains of FRL2 does not inhibit FRL2 activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 33750–62.
- Vigoreaux, J. O.** (2001). Genetics of the *Drosophila* flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems. *Bioessays* **23**, 1047–63.
- Vinckier, A. and Semenza, G.** (1998). Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **430**, 12–6.
- Vogel, B., Meder, B., Just, S., Laufer, C., Berger, I., Weber, S., Katus, H. A. and Rottbauer, W.** (2009). In-vivo characterization of human dilated cardiomyopathy genes in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 516–22.
- Wallar, B. J. and Alberts, A. S.** (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **13**, 435–46.

- Wang, S. M., Greaser, M. L., Schultz, E., Bulinski, J. C., Lin, J. J. and Lessard, J. L.** (1988). Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *J. Cell Biol.* **107**, 1075–83.
- Wawro, B., Greenfield, N. J., Wear, M. A., Cooper, J. A., Higgs, H. N. and Hitchcock-DeGregori, S. E.** (2007). Tropomyosin regulates elongation by formin at the fast-growing end of the actin filament. *Biochemistry* **46**, 8146–55.
- Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S. W. and Schnorrer, F.** (2014). Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in *Drosophila* flight muscle. *Curr. Biol.* **24**, 705–16.
- Welsh, I. C., Thomsen, M., Gludish, D. W., Alfonso-Parra, C., Bai, Y., Martin, J. F. and Kurpios, N. A.** (2013). Integration of left-right Pitx2 transcription and Wnt signaling drives asymmetric gut morphogenesis via Daam2. *Dev. Cell* **26**, 629–44.
- Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzner, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J. S., Chen, M., Wallar, B. J., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G.** (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **6**, 820–30.
- Willis, M. S., Schisler, J. C., Portbury, A. L. and Patterson, C.** (2009). Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc. Res.* **81**, 439–48.
- Witt, C. C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H. and Labeit, S.** (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J.* **25**, 3843–55.
- Woychik, R. P., Maas, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F. and Leder, P.** (1990). “Formins”: proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature* **346**, 850–3.
- Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L. and Eck, M. J.** (2004). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**, 711–23.
- Yaffe, D. and Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725–7.
- Yamashiro, S., Cox, E. A., Baillie, D. L., Hardin, J. D. and Ono, S.** (2008). Sarcomeric actin organization is synergistically promoted by tropomodulin, ADF/cofilin, AIP1 and profilin in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* **121**, 3867–77.
- Yamashita, M., Higashi, T., Suetsugu, S., Sato, Y., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kita, T., Takenawa, T., Horiuchi, H., Fukai, S., et al.** (2007). Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain. *Genes Cells* **12**, 1255–65.

- Yi, K., Guo, C., Chen, D., Zhao, B., Yang, B. and Ren, H.** (2005). Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **138**, 1071–82.
- Yonetani, A., Lustig, R. J., Moseley, J. B., Takeda, T., Goode, B. L. and Chang, F.** (2008). Regulation and targeting of the fission yeast formin cdc12p in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2208–19.
- Zuniga, A., Michos, O., Spitz, F., Haramis, A.-P. G., Panman, L., Galli, A., Vintersten, K., Klasen, C., Mansfield, W., Kuc, S., et al.** (2004). Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev.* **18**, 1553–64.